

VOLUME 13
NUMBER 3
2005

<http://www.blood-sub.jp/>

報告: 第12回 日本血液代替物学会年次大会
を開催して

総説: 血液代替物 - 総論 -

“人工酸素運搬体作製に関する基本的
留意事項(案)”を解説する

人工酸素運搬体の脳虚血に対する効果

海外文献紹介:

P_{50} 値の低いヘモグロビンによる酸素
ターゲッティング: 酸素治療の新しい
原理

Announcement

Report:

The 12th Annual Meeting of The
Society of Blood Substitutes, Japan

Review:

Blood Substitutes ... An Overview

Interpretation of A Guidance for Oxygen
Carrier Products and Their
Manufacturing Proposed by The
Society of Blood Substitutes Japan

Effects of Liposome-Encapsulated
Hemoglobin on Cerebral Ischemia

Topics:

Targeted O_2 Delivery by Low- P_{50}
Hemoglobin : a New Basis for O_2
Therapeutics

人工血液

第 13 卷 第 3 号 2005 年 11 月

目次

報告	第12回 日本血液代替物学会年次大会を開催して.....武岡真司	98
総説	血液代替物 - 総論 -	A Gerson Greenburg 100
	“人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を解説する高折益彦	104
	人工酸素運搬体の脳虚血に対する効果	織田禎二 112
海外文献紹介	P_{50} 値の低いヘモグロビンによる酸素ターゲティング： 酸素治療の新しい原理	酒井宏水，土田英俊 122

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 13 No. 3 November, 2005

Contents

<i>Report : The 12th Annual Meeting of The Society of Blood Substitutes, Japan</i>	<i>Shinji Takeoka</i>	98
<i>Review: Blood Substitutes ... An Overview</i>	<i>A Gerson Greenburg</i>	100
<i>Interpretion of a Guidance for Oxygen Carrier Products and Their Manufacturing Proposed by The Society of Blood Substitutes Japan</i>	<i>Masuhiko Takaori</i>	104
<i>Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Cerebral Ischemia</i>	<i>Teiji Oda</i>	112
<i>Topics: Targeted O₂ Delivery by Low-P₅₀ Hemoglobin : a New Basis for O₂ Therapeutics</i>	<i>Hiroshi Sakai, Eishun Tsuchida</i>	122

第12回日本血液代替物学会年次大会を開催して

大会長 武岡 真司

(早稲田大学 理工学術院 教授)

2005年6月6日(月)ならびに7日(火)に早稲田大学国際会議場にて第12回日本血液代替物年次大会を開催致しました。血液代替物の創製や評価の研究に携わっている医薬系や理工系のアカデミアから血液製剤の製造や血液代替物の開発に携わっているインダストリーからの研究者、血液行政や血液事業に関与されている方が一同に集い活発な討議を行うことができました。これも一重に発表者、座長、そして参加者の方々のご協力によるものと心より感謝申し上げます。また、来賓として、厚生労働省医薬食品局血液対策課血液対策企画官 浦山隆雄氏、日本赤十字社事業局技監 田所賢治氏が参加されました。

本稿では、本年次大会の内容を個人としての感想を交えながら、簡単にご報告したいと存じます。先ず開催時期ですが、この1週間後に米国ブラウン大学にてG. Greenburg教授主催の第10回International Symposium on Blood Substitutesが開催されましたが、本学会の開催日をあえてその直前に選びました。私自身もそうなのですが、発表者の先生方はどなたもとでも忙しく、学会の直前まで十分な準備ができません。そこでこの2、3週間に血液代替物の発表のために集中していただき、本学会での発表や活発な議論そしてその興奮冷め止まぬ状態のまま国際会議に入って頂き、その内容を大いにアピールして頂ければ、それも本学会の成果の一つと思いました。そして、プログラムですが、抄録集(人工血液Vol.13(2))の挨拶にも書きました通り、恐らくこの2年の間に二つの国内企業が赤血球代替物の臨床治験に入る予定ですので、その開発企業による進捗状況とパネル討論をワークショップ1として企画しました。それに対して、現在学会にて作成しております、「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項」に関して、その解説とパネル討論をワークショップ2として企画しました。その他、ウイルス・プリオン対策、赤血球代替物の安全性と適応、そして血小板代替物、治療用抗体医薬、改良型赤血球や幹細胞からの血球細胞の誘導など、それぞれ大きな進展が見られ、プログラムに組み入れました。すると予想通り、たいへん窮屈なプログラムになってしまい、発表時間はワークショップや特別講演を除いて15分間とたいへん短く、十分な討論は難しくなっていました。これは反省点の一つであります。その代わりに、ポスターセッションを急遽企画し、そこで十分な討論ができるようにし、若い世代の発表討論の場としました。ポスターは21件発表されましたが、ポスターに回って頂いた方にはここにお詫びを申し上げます。また、ポスターも司会による進行の元で発表してもらいながら各発表を回る企画などが必要であったかもしれません。

初日の最初に「ワークショップ1 開発企業による赤血球代替物の開発動向」として各企業の開発担当者から最新動向が報告されました。先ず、赤血球代替物の原料であるヘモグロビンを期限切れ赤血球に求める場合のウイルスやプリオンの対策やリコンビナントヘモグロビンへの原料シフト計画などが報告され、特にウイルス不活化の方法とそのバリデーションをどこまで行うのかについては会場からの質問も多く、行政としての期限切れ血液製剤を用いる場合の課題を早急に整理し、その対応を何等かの形で開発側に示すことが求められることになるかもしれません。また、開発企業側からは臨床治験までのスケジュールが示され、この1、2年の内に非臨床試験を経て臨床治験が開始される計画が報告されました。既に、修飾ヘモグロビンは欧米で治験が進んでいるものの、ヘモグロビン内包リポソーム型では世界初の臨床試験となるので、これを待望していた本学会会員の大きな関心事であると共に、学会としてそのための周辺環境の整備にどう取り組むのかが課題になると思われる。今後、その具体的な進捗状況が本学会にて報告され、活発なる討議が行われ、製剤の性状とその使用に対する正確な理解と新たな適応開拓によってすそ野が広がることを望みますし、それによって本学会の活性化にも繋がるものと思われる。

昨年に提出されたFDAのGuidanceに対して、「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項」の作成が本学会の活動の一環として行われたことが小林会長より紹介され、その内容が「ワークショップ2 人工酸素運搬体の製造に関するパネル討論」にて、その発案者である高折博士から解説され、薬事サイド、開発企業サイド、医学サイドからのパネリストを集めて討論がなされました。ワークショップ1を引き継ぎ、血液新法によって特定生物製剤に位置づけられる赤血球代替物製剤に対するレギュレーション整備の必要性、留意事項に数値を求めることに対する意見、大量投与を伴うリポソーム製剤としての特殊性を鑑みた留意事項であるための意見や指摘がありました。更に会員の意見を広く徴集してより有効な留意事項にバージョンアップさせることが、今後の重要な学会活動となると思われます(本誌に詳細な記事がある)。

赤血球代替物の安全性に関しては特に免疫系や体内動態、出血ショックモデル投与後の各種パラメーターに関する報告があり、適応に関しては腫瘍の酸素加や虚血再灌流、体外循環モデルの検討内容が報告され、酸素運搬体の酸素親和度や酸化ストレスに対する効果などが議論されました。

2日目は、中国からの新しいマテリアルが提案され、また初日

に引き続きウイルスの除去，不活化，貯留保管やRudolph博士によるプリオン分析などが議論されました。また，Intaglietta教授から高酸素親和性の人工酸素運搬体の末梢組織の酸素化に対する効果とその機構と共に解説され，更なる議論は必要ではあるものの，より効果的な酸素運搬体の製剤設計に一つの指針が提示されたものと思われます。

血小板代替物の研究動向では，我が国独自のリコンビナント蛋白質GPIb やフィブリノーゲンの鎖ドデカペプチドを担持させたアルブミン重合体やリポソームについて，医工学的なin vitro, in vivoの検討が進み，血小板減少モデルラットでの出血時間を有意に短縮させる有効性が示されたが，Rudolph博士からの凍結乾燥血小板ではヒト由来血小板の利用ではあるものの感染や保存に対する懸念を払拭するデータも効果と共に細かく提示され，血小板代替物の開発グループとして大きなインパクトとなったと共に，我が国の研究も加速するの必要を感じました。

幹細胞からの血球の誘導も究極的な血液代替法であり，現段階ではまだ可能性の域を出てはいないと思われるが，人工臓器の先には再生医療があるのは間違いないので，人工臓器の研究では一定の成果を挙げている我が国としては，両者が互いの情

報を密に交換して相乗効果を創出しながら再生医療の進展を促して行かなければならないと思われます。最後に抗体医薬の開発では，網羅的な抗体ライブラリーの進展と臨床を目指した動向が示され，重要な抗体医薬の開発，特にテイラーメイドな癌の治療の可能性も示されました。迅速な抗体医薬の開発は，例えば新型インフルエンザの脅威に曝されている全人類にとって朗報になると思われます。そのほか遺伝子組換え蛋白質の発表があり，血液成分のうち蛋白質製剤においては確実に組換え体による代替が進んでいる状況を再確認できました。この様に日本血液代替物学会は，血液成分の機能の解明から機能を代替する製剤の開発にスポットライトを当てた境界領域の学会であり，血液に関連する新しい製剤がインキュベートされる場であると言えます。

最後に本大会の開催に協賛いただいた，ニプロ(株)，(株)オキシジェニクス，三菱ウェルファーマ(株)，(財)化学及血清療法研究所にこの場を借りて御礼申し上げます。

次回は慶應義塾大学医学部の末松 誠教授が大会長をされます。独創的なプログラムが生まれ，より活発で実りの大きな学会となることを祈ります。

Blood Substitutes...An Overview

血液代替物 - 総論 -

A Gerson Greenburg, MD PhD

本総説は、本年6月12日から15日まで米国ロードアイランド州プロビデンスのブラウン大学にて開催された第10回国際血液代替物シンポジウム (The X International Symposium on Blood Substitutes) において、大会長G. Greenberg教授からの大会長講演“ Blood Substitutes . . . An Overview ”にて発表された原稿をご本人の承諾を得て掲載するものである。

It is with the greatest pleasure and a distinct honor to welcome you, the community of scholars and investigators in the field of Blood Substitutes, to Providence and the Brown Campus for this, the 10th International Symposium on Blood Substitutes. From far and wide, all continents are represented and I am extremely gratified by the response of scientists and clinicians to the call for this meeting. Since I was named President of this congress when last we gathered in Tokyo at the superb meeting hosted by Drs Kobayashi and Tsuchida I have spent many an hour worried about how to make this a memorable event. In the end, my anxieties were eased considerably once the abstracts began to arrive. The volume and the quality of those submissions let me know that the meeting would be excellent. The contributions of many of you, the community of "blood substitute" scholars, are what will make this meeting outstanding, not any special effort or contribution of mine.

We are a small group of investigators working in a highly specialized area of interest with input from many different scientific disciplines, a necessary multidisciplinary approach that is required as we go about resolving issues related to replacement of blood. Over the past 30 years or so, at the nine previous symposia and between them, we have come to know each other intellectually and socially. Together and alone, along different paths academic and commercial, we have forged progress in the field. Each of us or our groups pursues different aspects of the many inter-related issues, each creates or works with conceptual models of what should be and each applies different interpretations of seemingly basic physiology to support our own pet theory or hypothesis about large picture or detailed problems. With all that has been accomplished, and there has been a great deal, together we still face significant barriers with great odds accumulating against success.

Despite the barriers real or perceived, the objective, the aim of the effort, the goal of creating a usable and useful, safe and effective substitute for *BLOOD*, that "very special juice", as Goethe noted in *Faust*, continues to be our collective objective. This meeting, perhaps more than any of its predecessors, with its outstanding contributions, demonstrates and displays the progress we have made towards reaching that here-to-fore elusive objective.

We all know that blood has many components and indeed many functions. As a solution or with its many parts it serves many roles: vascular volume, oxygen delivery, cellular and protein clotting factors and elements of the host-defense mechanism. It also affords oncotic and osmotic properties to balance compartment volume and help in maintaining electrolyte balance. The idea of a "blood substitute" seems almost enigmatic for replacing all of these known functions with a single solution would appear on the surface to be somewhat problematic. .

Years ago, at one of our earlier gatherings, I challenged the use of the term "blood substitute", perhaps naively, when describing the work being done at the time. The field was then primarily focused on exploration of oxygen carrying vascular volume expanders, "red colloids" with osmotic properties. If acellular solutions without oxygen delivery capability were effective resuscitation fluids, consider how much better it might be if that solution had the ability to carry and deliver oxygen to the oxygen starved tissues to allow restoration of normal metabolic processes. I want you to hold that thought knowing that I will return the historical aspects in a few moments.

The "modern era" of blood substitutes begins with the seminal work of Dr Thomas Chang, the honorary President of this symposium, with his 1957 effort describing neo-hemocytes and the 1964 work describing cross linking of

Professor of Surgery, Brown Medical School Chief, Clinical Quality Management, The Miriam Hospital Providence, Rhode Island

論文受付 2005年8月30日 論文受理 2005年9月20日

hemoglobin to create a poly-hemoglobin for incorporation into those synthetic cells. This morning Dr Chang will bring you up-to-date on his latest work; his work that is on the forefront and cutting edge of the field. The work he will describe is as much a product of what we, collectively, have learned about substitutes for blood as it is an object lesson in application of what we have learned over the years about the role of oxygen as the vital force for cell, organ and organism survival. *We are after all obligate aerobic organisms; we need oxygen to survive.*

The role of an oxygen dependent physiology with perturbations imposed by various clinical disease states with altered physiologic conditions becomes an issue for consideration whenever one contemplates the design of newer generations of "blood substitutes". With our greater appreciation and expanding knowledge of the pathophysiology of shock and ischemia, reperfusion injury and cellular metabolism in health and disease, it is clear that the notion of a "red colloid with oxygen carrying capacity" as a blood substitute may have more than one useful application. With an ever expanding knowledge of the clotting mechanism and the immune /host-defense systems additional challenges for replacement or understanding physiologic interactions provide alternative pathways for application, apart from the path to clinical application in shock and trauma. The more we learn about the systems involved and the properties of any of the blood substitute solutions the more complicated become the interpretation of outcomes and adverse events. New knowledge adds complexity to the general problem, further complicating the task of generating a single solution for all applications. That is not to be viewed as a bad conclusion for it may be that a family of "blood substitutes", each with specific activity, is likely to achieve clinical application; component therapy if you will, an approach not dissimilar from the way that blood and blood products are currently used.

The history of "blood substitutes" is really quite interesting, indeed fascinating from many perspectives. Some day, when older and grayer, I plan to compile a definitive history of our field; however, that day has not, as yet, arrived. That the history of blood substitutes would be closely intertwined with the history of blood transfusion should come as no surprise to anyone here. The details of that interaction are a tale too long to relate here.

In the 1930s Amberson clearly laid out the issues that needed to be addressed and resolved in the process of developing a clinically acceptable " blood substitute". While he was able to demonstrate that a cat whose complete blood volume was

replaced with a very crude-- by today's standards--solution of hemoglobin could land on its feet if dropped from a height, he was also keenly and perceptively aware of the many issues that needed resolution before a clinically viable solution could appear. Unfortunately for him, the science and the technology of the times could not support an appropriate exploration of the concepts he proposed. It was nearly 60 years later that the issues Amberson raised could be addressed in earnest. By then, technology to create pure hemoglobin solutions was available, structure function relationships of proteins were gaining an appreciation from the scientific world, site directed chemical modification of proteins was being explored and the dream of substitute for blood, at least one element of that complex solution, seemed a certainty.

But knowledge spawned problems. As the knowledge base grew more unanswered and unanswerable questions arose with respect to the solutions and the applications. The result: the creation of a stringent cascade of required additional pre-clinical and clinical studies to be accomplished before licensure for clinical use would occur. Establishing a profile of safety and efficacy became an essential element of the commercialization of some very well characterized candidate solutions. How and why some of these solutions failed in the more advanced stages of clinical testing poses some interesting questions, some of which might be addressed if not answered over the next few days. Of course, valid testing requires certain criteria to be met, especially the selection of appropriate control groups identified and defined measures of efficacy built into the model systems. A lingering concern has been the ability of pre-clinical studies to predict the adverse events noted in some of the human trials dating back to the late 1970s.

Progress in the field can be found in the literature including the open roads, detours and dead ends. It is all accumulated there in one form or another. The literature on "blood substitutes", a term used to search PubMed and Ovid, accounts for approximately 0.2% of the literature in those databases. Two of every 1000 papers deal with our field. This is obviously a partial list, subject to the vagaries of the coders at the National Library of Medicine and likely has missed many symposia presentations and the like. About 50% are somehow related to "human studies"--probably because the hemoglobin in use was from a human source--and 19% are review articles. It seems there are writers who like to assemble the data and add their own interpretation to the accumulated literature. Approximately 40% of the literature has appeared in the past 9 years, 48% somehow linked to human studies--highly doubtful--and nearly one-third review

articles. Successes and failures, triumphs and false starts, they are all out there to be found if you look.

Skeptics still question whether hemoglobin is nephrotoxic. The notion of nephrotoxicity arose when Sellards and Minart in 1911 infused lysed red blood cells into subjects and noted red urine and renal failure. They were using the knowledge of the times, as poor as it was. From this study the urban legend of hemoglobin renal toxicity has persisted despite the enormous volume of clinical data that shows chemically modified hemoglobins do not have nephrotoxicity, period. How to expunge this misinformation from the literature and the teachings in medical schools is a subject worthy of consideration, but not here.

In the early days of the modern era, early 1970s, there were concerns about coagulopathy associated with the hemoglobin solutions. This turned out to be mostly a technical issue related to how well the red cell stroma was removed in the manufacturing process. When residual cell wall phospholipids were present a variety of coagulopathies were observed. Newer technology, better preparation methods, improved chromatography and filtration methodologies have all but eliminated this as an issue. Many of the newer hemoglobin solutions start with a very pure solution of hemoglobin A1, providing a stable substrate more amenable to chemical modification. And chemical modification is alive and well as many papers at this meeting will attest. Whether by chemistry or recombinant technology chemically modified hemoglobins appear here to stay for the modification is what drives the prolongation of intravascular half life and perhaps improves the oxygen delivery capability of the cell free solutions. Site directed, specific chemistry provides testable solutions of constant composition, a real advantage for advancement of the field.

A host of polymerization schema quickly followed modification of the structure-function relationship of the four chains of the hemoglobin molecule through the use of a DPG analog and reduction chemistry. The idea was to create a hemoglobin with better functional properties and an improved intravascular persistence. I selected PLP in 1973 because it was available and less costly than some of the other analogs of DPG, nucleotide and nucleoside phosphates, we had evaluated.

Without the contributions of the Benesch's chemical modification of hemoglobin might have waited another decade or two; the DPG story is integral to the development of the modern hemoglobin based substitutes now in various stages of development and testing.

Along the way other interesting approaches to creating

oxygen-carrying solutions were tried. In retrospect, many of these approaches were of unique academic interest to the chemists but not likely to attain clinical application even if pushed beyond the laboratory scale effort. Examples include a variety of porphyrin derivatives with very short half life in the circulation and cobalt based oxygen binding substituted porphyrins that had the distinct characteristic of changing from blue to yellow in the transition from oxy to deoxy, or the reverse...not particularly practical but very interesting chemistry!

All sorts of interesting questions about blood substitutes, especially the hemoglobin-based fluids have been addressed over the years... some with resonance related to application and others perhaps purely intellectual inquiry or even speculation.

The chemistry of polymerization, the means of prolongation of intravascular persistence, has its own long story. And, of course, it has a whole series of questions related to the process from composition of the solution to the critical area of Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion, ADME. Should it be site specific or generic? Is there an ideal molecular weight or weight distribution of the modified hemoglobin in solution? Does it matter, clinically? And if so, how? As we will learn later this week, lower animal forms exist with very large hemoglobin molecules as their oxygen carriers. Has the time come to reconsider what the polymer and solution should look like? Should the normal sigmoidal shape of the oxyhemoglobin dissociation curve be preserved? What happens when it is not? If the relationship loses its cooperativity will there be a detectable clinically relevant impact on oxygen delivery? Can the curve be shifted too far to the right, off loading the oxygen too easily leading to "oxygen toxicity" however one elects to define that term? These are but a few of the many unanswered questions that reappear with regularity; solid reliable answers are still being sought.

We know animals with near total exchange transfusion with ordinary, low P50 stripped hemoglobin can and will survive as Rabiner and Peskin noted in 1967. Why then is there an imperative to improve on this observation when translating the work into the clinical arena? One obvious answer would be, somewhat cynically, "humans are poor models for our animal experiments" and not be far from the truth. Another possible response lies in the fact that when a hemoglobin based red cell substitute is actually available, its use-independent of its labeled indications--will likely be far

broader than anticipated. The duration of persistence and the ability to deliver oxygen to normal tissues to avoid compromise and possibly rescue some ischemic tissue are directly related to the clinical situation at hand. There are times when longer persistence is desirable and other times when that may not always be the case. The blood substitute, in this instance a hemoglobin solution, may be life sustaining until definitive therapy can be effected or it may be a temporary application until bleeding has been controlled and red cells are available.

Will the acellularity of these solutions be important in some applications? One would like to think so. The idea of ischemic rescue of brain or myocardium subjected to loss of blood flow remains valid. Whether the encapsulated hemoglobin materials will be effective in this application will depend on many things, some of which will be discussed here this week. Hemoglobin based substitutes have the unique property of being able to scavenge nitric oxide, NO, a very potent vasodilator. NO is known to be elevated in sepsis. Could the hemoglobin-based solution be helpful in this clinical situation? Experimental data would indicate a real potential area of use and since many patients in our modern hospitals succumb to sepsis this would be a significant contribution to clinical medicine.

Over the next few days we will be hearing a great deal more about these oxygen carrying solutions. Aspects of their design to minimize NO affinity while not interfering with oxygen delivery through a variety of means will be noted. Genetic engineering of the hemoglobin molecule to achieve specific properties considered good in terms of proposed applications will be discussed. Manufacturing of hybrid molecules, chimeras if you will, half bovine half-human to optimize the special properties of each with or without additional modification will be presented. Creation of oxygen carrying proteins, heme-albumin compounds is an attractive alternative worthy of consideration.

Obtaining a constant and safe source of hemoglobin remains problematic. The costs involved in a recombinant program whether it is bacterial culture, yeast production, plant or genetic modification of mammals is believed to drive the cost of a gram of product to unsustainable levels in a competitive market. And that statement assumes a *better* safety and efficacy profile than the control group, what ever that is.

Addressing these issues over the years has been and continues to be exciting to me; and addressing them still poses many challenges. We are rich in science, and our field has drawn newcomers with fresh ideas. I look forward to watching all of this play out over the next few years.

Of course, there is competition from a variety of quarters

including the entire concept of transfusion medicine and the indications for transfusion of red cells. It remains clear that blood and blood product use is highly varied and inconstant from surgeon to surgeon and institution to institution within and between countries. Despite the publication over a decade ago of 5 different guidelines for the use of blood and blood products, little has changed with respect to blood usage. The educational efforts have not had a major impact as yet. Changing habits and behaviors long held is a most complicated task.

And yet, there is the perception from many quarters that a substitute for blood is something the world needs as the supply decreases and use is curtailed by concerns about the safety of the blood that is available.

Interest in perfluorocarbons has not died, just faded somewhat from the picture. The literature of the 1960s and early 1970s has a great deal of information about them. They continue to have great potential and many of the most recent advances are presented here this week. They remain an interesting potentially viable work in progress. The chemistry is interesting, the non-biologic properties desirable.

There is a great deal of interest in the current efforts exploring artificial platelets and coagulation factors. A number of sessions at this meeting have been incorporated into the program to discuss this exciting and provocative area. We have assembled some of the world's experts in this emerging field to present their work and discuss applications as this area of interest and need expands.

Many other aspects of "blood substitutes" are on the menu the next two and a half days. We have poster sessions, workshops plenary sessions and lectures, paper presentations and a great deal of time for interaction with old friends and the making of new ones.

This is a very large and complex program with many topics and material of general and specific interest for all of you.

We will be hearing of developments from around the world, a true international approach to the sharing of information and ideas. Our intent is to cover the field as it exists today and, being repetitive, it is your contributions that have made this program what I consider an outstanding forum....

This is a time to learn, think, conceptualize and hopefully incorporate new ideas into the creative effort. If that does occur in the near or long term, if you have one idea that goes forward as a result of attending this meeting my colleagues and I will have succeeded in our mission.

Thank you....

“人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を解説する

Interpretion of a Guidance for Oxygen Carrier Products
and Their Manufacturing
Proposed by The Society of Blood Substitutes Japan

高折益彦

Masuhiko Takaori

和文抄録

わが国において開発されたりポソーム小胞体内にヒトヘモグロビン(Hb)を内包させた人工酸素運搬体, すなわち生理食塩液浮遊りポソーム型ヘモグロビンに関する前臨床試験はほぼ完成の域に近づいてきている。そしてすでに2, 3の企業が次の段階, すなわち工業生産化, 治験第1段階を目指している。このような情勢にかんがみ赤血球代替物として開発される人工酸素運搬体として現時点で付帯すべき安全性, 有効性に関する必要条件を明確にしておくことは重要課題である。そのため日本血液代替物学会は“人工酸素運搬体作製に関する留意事項”としてその原案を提示した。本稿においてはこの留意事項の各項について, それらが持つ意義, 必要性について検討を加えた。さらにその工業生産工程での留意事項, ならびにその過程における倫理上の問題点についても検討した。さらにこのような人工酸素運搬体の初期段階での臨床使用, たとえば希釈式自己血輸血(体外循環使用をふくむ), 病院の内外での急性出血処置への応用についても論及した。

Abstract

Preclinical tests for liposome encapsulated hemoglobin as a new oxygen carrier are being almost completed. Some companies have intended to carry it on manufacturing system and then to design its phase I clinical trial in the near future. Accordingly it is necessary and useful at the present time that safety and efficacy of artificial oxygen carrier as an erythrocyte substitute should be defined and also its manufacturing process should be proposed from scientific and ethical view point. Recently“ The Society of Blood Substitutes, Japan ”presented a guidance for its requiring properties and manufacturing system. This review introduced the guidance and attempted to interpret in its details, such as physicochemical and biological properties of the liposome-encapsulated hemoglobin, evaluation for influence on vital functions in experimental subjects after its administration, establishment of consistent processing and qualifying system. This review looked over further clinical use, such as hemodilutional autologous blood transfusion or treatment for unexpected, massive bleeding, of artificial oxygen carriers at the first step.

Keywords

guidance, artificial oxygen carrier, manufacturing system, ethics, clinical application, qualification, property

はじめに

少子高齢化にともなう献血志望者の減少, さらに新たな輸血感染症の出現等により最近では輸血用血液の供給に障害をきたすようになってきている。この深刻な問題はひとりわが国の問題だけではなく, ひろく全世界共通の問題にもなっている。このような情勢に対して人工酸素運搬体を速やかに開発, 臨床

応用に導くことはひとりわが国の医療体制への貢献のみならず全人類への福音でもある。むしろ赤血球に代わる人工酸素運搬体の開発のみが上記の問題すべての解決とはならない。しかし赤血球の利用が献血される血液成分の中でもっとも高いことを考慮すれば, 人工酸素運搬体の開発の重要性は明かである。すでに前世紀初頭から人工酸素運搬体開発は進められてきて

いる。そしてようやくこの数年間に臨床使用に耐えうるような人工酸素運搬体の出現を見るに到った。とくにわが国においてはリポソーム小胞体内にヒトヘモグロビン (Hb) を内包した人工酸素運搬体、すなわち細胞型 (cellular type) 人工酸素運搬体の開発が進められ、前臨床試験の段階ではほぼ完成の域に近づいてきている。そしてすでに2, 3の企業が次の段階、すなわち工業生産化、治験第1段階を目指している。このような情勢にかんがみ臨床使用を目的とした人工酸素運搬体として付帯すべき条件を明確にしておくことは重要であると考えられる。人工酸素運搬体の安全性、有効性に関する必要条件等について米国を中心にすでにいくつかの提案がなされている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。そこで今回、日本血液代替物学会は社会からの一般的な理解が得られ、諸企業がその開発、生産を容易ならしめるための人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項 (以下、留意事項) を提案することになった (Table 1. 別紙p.110)。本稿においては今回提示された留意事項の各項が持つ意義、必要性などを述べ、ついでそれらについての検討を加えることとした。

1. 開発の対象となる人工酸素運搬体

過去にも種々の物質、加工物が人工酸素運搬体として用いられないかと研究されてきた。そしてすでに臨床試験にまで到達したもの⁶⁾⁷⁾もあった。そしてこれらはただ単に輸血用赤血球の代替としてだけでなく、組織の超酸素化、呼吸不全の治療などと種々の臨床応用にも考えられていた⁸⁾。しかし今回、提示された留意事項での人工酸素運搬体は生体の血管系を循環し、組織に酸素を運搬、供給して組織の酸素代謝を改善、維持する機能を有するものを対象としている。すなわち少なくとも現段階での開発対象は出血に対する治療で赤血球輸血に代わるものとしている。したがって以下に述べる人工酸素運搬体の性質、臨床応用などもすべてこの目的に適合するものとしている。ただしわが国で現在開発されている人工酸素運搬体はヒトヘモグロビン (Hb) をリポソームに内包させたりポソーム型Hbを酸素運搬体としている。そしてそれを生理食塩液中に浮遊させたものである。もし将来、リポソーム型Hb以外の酸素運搬体を使用する、あるいは生理食塩液以外の溶媒 (たとえば人工膠質液: hydroxyethyl starch液) を使用する場合には別途そのための“留意事項”を作製することが必要となる。

2. 製品の物理的、化学的、生物学的性質

製品としてはリポソーム型Hb粒子が溶媒内に均一に分布していることが望まれる。もし保存中に溶媒内に沈殿しているような場合、臨床使用の場における攪拌操作にて完全な均一化が得られる保証がない。したがって製造時から、そして保存時にもリポソーム型Hb粒子の溶媒内での均一分散が保たれていることが要求される。また循環血液中、すなわち流動状態においてもリポソーム型Hb粒子同士が集合、凝集することなく、各粒子が血液中、少なくとも大・中血管内では均一に分布していることが望まれる。

リポソーム型Hb粒子がすべての血管系を循環するためには

管腔径がもっとも狭い毛細血管系を通過しなければならない。かりにも同部を通過することができず、その部において閉塞をきたすことがあってはならない。赤血球は変形能を有するゆえに直径2-3 μm の管腔を通過することができる。しかしリポソーム型Hb粒子には変形能はなく、いわば剛体である。そのため少なくとも粒子直径が1 μm 以下でないと毛細血管系を通過できない。またその際に生理的な灌流圧で通過しうることも必要である。

製品を血液中に投与した場合、血液の粘度に大きな変化をあたえることは好ましくない。すなわち赤血球に凝集、集合を発生させて血液粘度を上昇させることも⁹⁾、また逆に血液希釈、血漿の粘度低下により血液粘度を低下させることも好ましくない¹⁰⁾¹¹⁾。後述するごとく、実際の臨床使用ではその用量に制限が加えられる。このような状態下では生体の血液と混合されるためリポソーム型Hb液の粘度値の範囲が比較的大きくても生体の血液粘度に大きな変化をきたすことがない。とはいえ臨床使用時にその高粘度のために注入速度が低下したり、加圧注入を必要とすることはあってはならない。したがって製品そのものの粘度も生理的な血液粘度に近い2.0-5.0 cps (50-100/sec \cdot 37) であることが望ましい。

またリポソーム型Hb粒子を血管内に投与した際には必ず周囲の血液成分、血管内皮細胞と接触する。そして異物として認識されて網内系細胞に貪食される¹²⁾。さらに細胞間質にリポソーム型Hbの構成成分が再度放出されて組織貯留をきたす可能性もある¹²⁾。このような組織、細胞との接触の過程においてリポソーム型Hb自身の変性、あるいはそれら組織、細胞に変性、あるいはそれらの機能に障害をあたえてはならない。またそれらとの接触によりそれらの組織細胞から、活性酸素などのフリーラジカル、生物学的メディエーターなどを遊離させることにより、临床上問題となるような生体反応を発生せしめないことが望まれる。この場合フリーラジカル、生物学的メディエーターなどの遊離は絶対に生じないという保証はない。しかしそれが临床上問題となるようなことがなければ受け入れられよう。

人工酸素運搬体としてのリポソーム型Hb粒子の機能性、すなわち有効性について第一に望まれることは組織への酸素の運搬、供給能力である。すなわちそれが生体の肺毛細血管内を想定した環境下、すなわち血液温度が37 $^{\circ}\text{C}$ 、pHが7.35-7.45、酸素分圧が100-200 mmHgで製品の100 mlが10 ml以上の酸素と結合し、末梢で酸素分圧が40 mmHg以下の微小循環血管内からその結合酸素の25%以上を放出することが望ましい。一般貧血患者での赤血球輸血を開始する基準は生体の血液中Hb値が6 g/dl (酸素含有量 = 8.6 ml/dl) となっている¹³⁾。したがってこの限界酸素量以上の酸素を運搬することが望まれる。そのため9 ml/dlを最低限界とすることも考えられる。一方、末梢組織での赤血球、あるいは人工酸素運搬体からの酸素放出は生理的条件により異なり、さらに高比率に放出する可能性がある。すなわち末梢組織で嫌気性代謝を起ささない限界静脈内酸素分圧を7.2 \pm 1.5 mmHg¹⁴⁾とするならば上記酸素含有量はさらに少なくとも許されることになる。しかし有効性、安全性を考慮

すれば上記の基準を適応するのが妥当であろう。

またリポソームに内包されるHbの酸素親和度、 P_{50} の選択についても同様のことが考えられる。このような人工酸素運搬体を使用する症例では一般に酸素吸入の適応となっている。したがって P_{50} が比較的高いHbを使用しても肺における酸素化は十分におこなわれる。そして末梢における酸素放出効率が大きくなる。一方 P_{50} が比較的低いHbを使用しても上記の末梢組織における限界静脈内酸素分圧以上であれば十分量の酸素放出が行なわれる。ただ P_{50} が高い、すなわち酸素放出が容易なHbを使用した場合には毛細血管レベル以前の細動脈レベルにて比較的大量の酸素を放出し、そのため細動脈の収縮をきたし、毛細血管血流量の減少をきたす可能性がある¹⁵⁾。一方 P_{50} が低いHbを使用する場合にはこのような可能性が少なくなる。さらに酸素吸入ができない状況下でも、また肺における血液酸素化機能が低下したような場合でもHbの酸素化が行なえる。

Hbを利用した人工酸素運搬体ではHbのメトヘモグロビン (methemoglobin: metHb) への変化 (メト化) の問題は重要問題である。一般に十分に酸素化された状態ではHbは次第にメトヘモグロビンに移行し、酸素運搬能力を消失する。生体の赤血球内metHbは赤血球細胞内の還元酵素の作用により再びHbに還元される。人工酸素運搬体としてのリポソームHb内にこの還元酵素を含有させることは技術的に種々の制限をうける。また封入し得たとしても次第に劣化してその機能を失う。このメト化速度は周囲の酸素分圧、温度に影響される。そこでリポソームHbが人工酸素運搬体として用いられるためには、想定される血液中条件、すなわち100-200 mmHgの酸素分圧、37 °Cの温度下でその変化速度 (半減期) が少なくとも12時間以上であることが望まれる。さもないと後述する生体内に投与した場合のリポソーム粒子の血液内消失速度と同様に実地臨床での利用価値が低下することとなる (実地臨床での人工酸素運搬体使用とその機能の項参照)。

3. 製品の安定性、純度

前項、製品の物理的、化学的、生物学的性質において述べた人工酸素運搬体の性質には室温、あるいは一般保冷库温度下において少なくとも1年間は変化しない安定性が望まれる。製品の開発目的の一つは製品を特殊な保管条件下でなく、室内、または一般保冷库内に常時保管し、必要に応じて直ちに使用できることにある。また使用期限を過ぎた献血血液を有効利用することも人工酸素運搬体に課せられた任務でもあるので、有効使用期間が短いものであってはならない。そのためには製品の性質、機能が少なくとも1年間は変化しないことが望まれる。

製品は中核となるHb、それを内包するリン脂質、さらにリポソーム型Hb粒子の分散性を維持するポリエチレングリコールなど製造過程において数多くの原材料を必要とする。そして最終製造段階にこれらの原材料物質が残存している場合にはこれを可及的に除去して製品化する。しかし完全にリポソーム型Hbのみを取り出すことは不可能である。すなわちこれらの残存不純物質の存在は避けられない。しかしそれが生体に毒性を、

また生体機能に影響を与えない程度の濃度に抑えることは必要で、それに適合した基準を設けることは必要である。

製品は薬剤である。したがってその無菌性、発熱性は日本薬局方に準拠した無菌試験法、エンドトキシン試験法にて確認することが必須である。

以上の性格・機能性、安全性、安定性、純度などはすべてin vitroにて検証することが可能である。次の段階、すなわち生体 (細胞、組織、動物など) での試験 (in vivo試験) 前に必ず施行、確認しておくべき事項である。

4. 生体投与にともなう機能性、安全性

人工酸素運搬体を作製する目的は臨床での使用である。治験第一段階、第二段階ではヒトを対象として検討される。しかしその前に前臨床試験として生物体を対象としてとして製造された人工酸素運搬体の安全性、機能性を検討しておかなければならない。

試験対象として初期段階では遊離細胞、培養組織をはじめ、小動物 (マウス、ラット等) を用いて検討を行なっても、次段階では中動物、大動物で検討を行なわなければならない。さらに機能性、毒性の一部については霊長類を使用して検討することが必要である。また各動物種について統計学的に有意差が得られる動物数にて検討されなければならない。

また開発新薬の安全性確認のための毒性試験として単回投与、ならびに反復投与を行なうことが規定されている。実際の臨床の場では人工酸素運搬体を1-2 ml/kg・minの注入速度で投与するのが限界と思われる。したがって前臨床試験ではその2-3倍の速度、すなわち3-5 ml/kg・minの速度で注入して安全性を確かめておくことが望ましい。臨床の場においては出血に対する処置として人工酸素運搬体を投与するため、その失血量に応じて等量、もしくは1.2-1.3倍量を投与することとなる。しかし前臨床試験で単純投与 (top loading) する場合には10-20 ml/kgが限界となろう。このような負荷試験は臨床での過剰投与時での安全性確認としてあっても良いと思われる。しかしもしこれ以上の量を投与することは血液量増加を負荷することとなり、リポソーム型Hbそれ自身の毒性以外の障害を生体にあたえることとなる。したがってさらに大量の投与を試みる場合には血液交換にて施行すべきである。すなわち生体の一定量の血液を廃棄し、同量のリポソーム型Hb液を投与する方式を採用すべきである。さらにまたその血液交換量が多くなる場合 (20 ml/kg以上) にはリポソーム型Hb液になんらかの膠質液の添加することが必要である。注入されたリポソーム型Hbは直ちに血管内から消失しないが、溶媒である生理食塩液は速やかに血管外に移行し、循環血漿量、ひいては循環血液量の減少をきたし、循環不全に陥る可能性がある。また逆に10 ml/kg程度の量でも連日投与すればリポソームの血管内滞留が生じ、そのために血液量の増加、血液粘度の上昇から循環不全をきたす可能性もある。反復投与での毒性試験の際にも十分な投与期間をおいた投与方法、たとえば10-20 ml/kg・weekの3-4回投与、あるいは0.2-0.4 ml/kg・dayの14日間連続投与などの投与方法を

選択すべきと考える。

生体機能への影響、毒性に関する検査・観察項目はこのリポソーム型Hbの特性を考慮するとともに、一般的な新薬開発での検定事項をふまえて留意事項(案)、Table 1.(別紙p.111)の5.3)に示される20項目などでの検討が望まれる。

生体内での人工酸素運搬体の機能として、投与されたりポソーム型Hbが肺にて酸素と結合、その一部を末梢微小循環系で放出し、組織の酸素代謝を改善、あるいは維持することが大命題である。その放出率、あるいは組織の酸素摂取率は各組織、臓器によって異なるが、現在開発対象となっているリポソーム型HbのようにHbを酸素運搬物質とするかぎり、前述の末梢組織で嫌気性代謝を起こさない限界静脈内酸素分圧¹⁴⁾以上の酸素放出は可能である。

生体の網内系は投与されたりポソーム型Hb粒子を異物と認識してそれらを貪食する。そのため血液中のリポソーム型Hb粒子は次第に減少し、ラットに20 ml/kg量を投与した場合でも一週間後にはリポソーム型Hb粒子が血液中に認められなくなる¹²⁾。すなわちラットでのその減少率は半減期として16-18hr¹²⁾¹⁶⁾と報告されている。このデータをヒトのそれに演繹した場合、この半減期は30 hr以上となると予想される¹⁷⁾。これは後述する臨床での人工酸素運搬体の使用、応用面で期待される半減期の12 hr以上を越えることとなり、現在のリポソーム型Hbは人工酸素運搬体として十分にその機能をはたすことになる。

5. 製造工程、品質管理

前臨床試験にて確実、かつムラのないデータを得るためには製品の均一性が常に得られていることが不可欠である。むしろ臨床にて使用する製品にはこのことがきびしく要求される。そのためには一貫性のある製造工程を確立していることと同時に製品の品質管理システムが確立されていることが必須である。むしろ製品への病原体、有害物質などの混入があってはならない。そのためには厳密に管理された環境下で製造されなければならない。この面でも上記の一貫性ある製造工程は有効であり必要である。さらに製品の品質を検定、確認する機構を確立しておくことが必要である。すなわち製造された製品は各ロット毎に検定されなければならない。

6. 倫理的配慮

製品の原料となるHbはヒト血液由来のものである。したがって製品の製造に携わる施設には原材料、ならびに製品の取り扱いが倫理的に適切に行なわれているか、またそれに携わる職員の倫理教育が十分行なわれているか、監視し、指導・教育する倫理委員会を組織することが必要である。また動物実験をふくめた基礎的研究においても国、ならびに当該施設が定めた管理規定に準拠して施行しなければならない。この指導、監視をふくめて倫理委員会は活動しなければならない。

7. 実地臨床での人工酸素運搬体使用とその機能

人工酸素運搬体の開発にあたり、その人工酸素運搬体が臨床

でどのように利用されるかあらかじめ想定しておくことが必要である。冒頭に述べたごとく人工酸素運搬体開発の目的は献血から得られた輸血用血液の有効利用、そして長期保存、随時使用可能な赤血球代替物の作製である。赤血球輸血を完全に代替する人工酸素運搬体の開発は最終目的ではあるが、そこに到達するにはあまりにも多くの、そして困難な問題を残している。まず投与されたりポソーム型Hb粒子の循環血液内滞留時間、Hbのメト化阻止などの問題である。とはいえ人工酸素運搬体の開発への社会的期待は大きく、かつ性急である。そのためわが国での現状をふまえてTable 2.に示すような臨床応用を当面の目的とすることを提案したい。すでにTable 2.における1)、2)への応用は他の人工酸素運搬体を用いて臨床で行なわれている⁷⁾¹⁸⁾。そして血液の酸素運搬機能を限られた期間でも人工酸素運搬体で代替するならば、生体自身の赤血球新生機能による循環赤血球量の回復が生じ¹⁹⁾²⁰⁾、同種血輸血を回避、あるいは節減することが可能となる。さらにTable 2.の3)への応用は蘇生輸液としての意義が大きく、とくに医療機関外(out of hospital)でパラメディカルによる使用に期待がかけられる。しかしこのような目的への人工酸素運搬体の使用についてあらかじめ二つの前提条件を設定しておくべきではないかと考える。

その一つはこの人工酸素運搬体の実地臨床使用量である。すなわちリポソーム型Hbを生理食塩水に浮遊させた製品では全く膠質浸透圧を有しない。したがって出血に対して血液の補いとして上記のリポソーム型Hb液を注入した場合、血漿量、すなわち血液量の維持はきわめて短時間にとどまる。そのため現在までの多くの基礎研究施行時にはアルブミン液をリポソーム型Hb液に併用している。むしろ臨床使用時にも膠質液、アルブミンの併用が必要となろう。しかし医療経済的な面からはアルブミン液に代わり人工膠質液を使用することが推奨されるが人工膠質液の使用量には生体の止血機能への影響を考慮して一般的に20-30 ml/kgとする制限がある。またたとえアルブミン液を使用すとしても凝固因子の希釈からほぼ同等の使用量が制限量となるであろう²¹⁾。したがって人工酸素運搬体(リポソーム型Hb)の使用量は一般的に20-30 ml/kgにとどまるものと思われる。

Table 2.

Clinical Application of Artificial Oxygen Carrier at the First Step

- 1) Replacement fluid for normovolemic hemodilution
- 2) Priming solution of cardiopulmonary bypass circuit
- 3) Alternative red blood cell transfusion for acute, massive bleeding before arrival of matched blood

第二にこのような赤血球代替物の投与後の作用、有効時間の問題である。少なくともリポソーム型Hbは一定時間、酸素運搬体として赤血球に代わる作用をはたすことは確実である。しかしその他の赤血球機能は兼備していない。また異物として作用することも明かである。したがって赤血球と同等に長く循環

血液中に滞留することはむしろ望まれない。Pageら²²⁾は人工酸素運搬体は6時間程度の酸素運搬機能を発揮すれば臨床的には十分ではないかと述べている。さりとて血液、とりわけ赤血球の代替物として一般臨床の場において、災害時、あるいは辺境の地での医療活動において使用されることを考慮すれば、少なくとも12時間程度はその機能を維持することが望まれるのではなからうか。

おわりに

以上、臨床使用に適した人工酸素運搬体の作製、製造について、その化学的、物理的、そして生物学的必要条件、とくにそのin vitro, in vivoでの安全性、機能性の面からの検討方法などについて述べてきた。そしてこれらをふまえてその製造工程、ならびに一般的な倫理的配慮の重要性についても考察した。人工酸素運搬体の性状、機能に対して要求される条件は追求すれば尽きるところがない。また開発に関する付帯事項、製造工程についての規制事項も厳密に考慮すれば限りがなく、実施面での対応は非常に困難となる。そのため臨床使用の時期に遅れを生じる。しかし人工酸素運搬体の開発、製造は今やわが国の医療、社会にとって差し迫った重要問題である。そのため現時点で製造できる製品の安全性、機能性を明確に把握し、それに適合させた臨床応用の範囲内でまず実用化すべきと考える。そして将来新たな技術が開発され、さらに優れた人工酸素運搬体が得られた時点ではその臨床使用の範囲を拡大すべきと考える。

この人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)の作製には厚生労働省科学研究(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)=人工赤血球の安全性向上に関する研究=研究事業の補助研究費の支援により行なわれた。そして本論文の要旨は第12回日本血液代替物学会において発表された。なおこの論文の作製にあたり新薬作製、製造に関する規制事項をふくめ多大のご教授、ご助言をいただいたバイオアクセラレーター株式会社の小澤健夫氏に心からの感謝を捧げる。

引用文献

1. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion* 1991;31:369-371.
2. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. *Transfusion* 1994;34:712-713.
3. Przybelski RL, Daily EK, Stern KN, Mattia Goldberg, C. A graded scale for assessment of safety of blood substitutes. *Transfusion* 1997;37:749-751.
4. Fratantoni JC. Red cell substitutes : Evolution of approaches for demonstrating efficacy In : *Blood*

- Substitutes - Present and Future Perspectives Tsuchida, E. ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998;33-39.
5. 高折益彦 . 人工血液としての条件—liposome-encapsulated hemoglobin の有効性, 安全性への検討 . *人工血液* 2002; 10:28-35.
6. Spahn DR, van Bremept R, Theilmeier G, Reibold J-P, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 1999;91:1195-1208.
7. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock : A randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 1999;282:1857-1864.
8. Agishi T, Ikeda Y, Iwashita Y, Kobayashi K, Kouro K, Matsushita M, Motoki R, Sekiguchi S, Taira A, Takaori M. and ed. Tsuchida, E. Safety and efficacy of red cell substitutes In *Artificial Red Cells : Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes* Ed. Tsuchida, E. John Wiley & Son, Chichester 1995;239-257.
9. 高折益彦 . 粘度 (viscosity) と赤血球集合 (erythrocyte aggregation) In : *代用血漿剤と臨床* 高折益彦編著 東京 克誠堂 : 2004;24-37.
10. Mazzoni MC, Tsai AG, Intaglietta M. Blood and plasma viscosity and microvascular function in hemodilution - A perspective from La Jolla California *Eur Surg Res* 2002; 34:101-105.
11. Tsai AG, Acero C, Nance PR, Cabrales P, Frangos JA, Buerk DG, Intaglietta M. Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am J Physiol* 2005;288:H1730-H1739.
12. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles(artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 2004;25:4317-4325.
13. Stehling LC, Doherty DC, Faust RJ, Greenburg AG, Harrison DF, Landers DF, Laros RK, Pierce EC, Prust RS, Rosenberg AD et al. Practice guidelines for blood component therapy : A report by the Am Soc Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. *Anesthesiology* 1996;84:732-747.
14. Richmond KN, Shonat RD, Lynch RM, Johnson PC. Critical PO₂ of skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 1999;277: H1831-H1840.
15. Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitute : Influence of

- O-2 affinity. *Am J Physiol* 1999;45:H553-H562.
16. Tsutsui Y, Kimura T, Ishizuka T, Oomoto S, Shizawa T, Goto H, Ogata Y, Kaneda S. Duration of efficacy NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model. *人工血液* 2002;10:36-41.
 17. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-709.
 18. Greenburg AG, Kim HW. Use of an oxygen therapeutic as an adjunct to intraoperative autologous donation to reduce transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Surgeons* 2004;198:373-383.
 19. Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with hydroxyethyl starch and dextran 40. *Arch Surg* 1970;100:263-268.
 20. 中山雅人, 小川重男, 高折益彦. 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究. *日本輸血学会雑誌* 1984;30:168-174.
 21. Johnson SD, Lucas CE, Gerrick SJ, Ledgerwood AM, Jiggins RF. Altered coagulation after albumin supplements for treatment of oligemic shock. *Arch Surg* 1979;114:379-383.
 22. Pape A, Kleen M, Kemming G, Meisnerr F, Meier J, Habler O. Fluid resuscitation from severe hemorrhagic shock using diaspirin cross-linked hemoglobin fails to improve pancreatic and renal perfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:1328-1337.

Table 1. 人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項（案）

1. 緒言

1) 目的

本事項は今後の臨床使用を目的とした人工酸素運搬体の製造のための基本を示したものである。

2) 背景

現在、開発が進められている人工酸素運搬体には数種存在するが、わが国においてはヒトヘモグロビン（Hb）をリボソームにて包埋したもの【リボソーム型ヘモグロビン（リボソーム型 Hb）】を生理食塩液中に浮遊させたタイプのものである。今後の臨床応用を目的とした製品の開発，作製にあたり十分な社会的理解と同意が得られるよう以下述べる基本的事項に留意する。

3) 適応対象物

以下述べる製品開発，製造に関する留意事項はリボソーム型Hbを生理食塩液に浮遊させたものに適用し，生理食塩液以外の溶液に浮遊させた製品に対しては別途規定を設ける。

2. 人工酸素運搬体の定義

赤血球に代わり循環系において酸素運搬をつかさどる人工生産物とする（以下“製品”）。とくに血液（赤血球）喪失時において組織酸素代謝の改善・維持をその主な目的とするものとする。

3. 製品の物理，化学，ならびに生物学的性質

1) 製品中のリボソーム型Hbは生理食塩水中にて均一に分散していること

2) 流動状態下においてもリボソーム型Hbの性状，分散性に変化を生じないこと

3) 製品の粘度は2.0-5.0 cps（37℃）であること

4) リボソーム型Hbは血液成分，血管内皮細胞，あるいは臨床にて使用される一般的な人工膠質との接触により結合，凝集を生じることなく，またリボソーム型Hb自身にも集合，凝集を生じないこと

5) 製品の100mlは酸素分圧100-200mmHg（37℃）の環境下において10ml以上の酸素と結合し，酸素分圧40mmHg以下の環境下において，その酸素の25%以上を放出すること

6) リボソーム型Hbの粒子サイズは容易に毛細血管大の管腔を通過できるものであること

7) 酸素分圧100-200mmHg（37℃）下でリボソーム型Hb内のヘモグロビンのメトヘモグロビンへの変化率（半減期）は12時間以上であること

8) リボソーム型Hbは循環系構成組織（血管内皮細胞など），ならびに血液成分（血球，血漿たんぱくなど）などとの接触により，临床上問題となる生体反応を発生しないこと

9) リボソーム型Hbは生体組織・細胞に作用して临床上問題となる生体反応を惹起するような活性酸素などのフリーラジカル，ならびにメデイエーターを産生，遊離させないこと

4. 製品の安定性，純度

1) 上記3.の1)～9)で述べた性質は室温，あるいは保冷库温度下において少なくとも1年間は変化しないこと

2) 製品中の遊離脂質，リン脂質，ポリエチレングリコールなどの製造工程由来，およびHbなど目的物質由来の不純物含有量に対してはそれぞれに適切な規格値を設定すること

3) 製品の無菌性，無発熱性を確認するために，日本薬局方の無菌試験法，およびエンドトキシン試験法に準拠した検討を行ない，日本薬局方の基準に適合すること

5. 生体投与にともなう安全性，機能性

1) 研究対象，投与方法（投与量，投回数）などについては以下の諸点に留意すること

(1) 対象動物種

培養細胞・組織，から小動物（マウス，ラット）までの基礎的検討とともに中動物，大動物（霊長類を含む）等を含めて総合的に検討する。

(2) 対象動物数

統計的有意差が得られる動物数を定める。

(3) 単回投与，反復投与にともなう検討

予想される臨床注入速度，その2-3倍の速度にてを投与する．

投与量は製品の特異性にかんがみ単回投与で10ml/kg未満とし，さらに増量する場合には血液交換で行ない，反復投与の場合には投与量に応じて十分な投与期間を設ける．

2) リポソーム型Hbは微小循環系血液中にてそれ自身のみならず共存する血液細胞成分にも集合，凝集を生ぜしめないこと

3) 生体機能への影響，あるいは生物学的作用について以下の検査・観察項目について検討すること

(1) 生物活性メディエータの遊離

(2) 精神活動，習性，神経機能

(3) 骨格筋，腱等を含む運動機能

(4) 心臓，血管系を含む循環機能

(5) 肺におけるガス交換機能

(6) 組織酸素代謝指標

(7) 血液生化学的組成，ならびに酸塩基緩衝機能

(8) 肝機能

(9) 腎機能

(10) 消化管運動・消化機能

(11) 内分泌機能

(12) 一般血液検査

(13) 血液凝固，止血機能，ならびに血栓溶解 (fibrinolysis) 機能

(14) 生体免疫・防護機能

(15) 生殖機能・発生毒性

(16) がん原性

(17) 遺伝毒性

(18) 各臓器，組織の病理学的変化

(19) リポソーム型Hbの体外移行，代謝

(20) リポソーム型Hbの臓器・組織沈着，蓄積性

4) 循環血液内に投与されたリポソーム型Hbは肺にて酸素と結合し，末梢組織にてその酸素の一部を放出することにより生体組織の酸素代謝を改善，あるいは維持しうること

5) 投与後のリポソーム型Hbの循環血液中での半減時間は12時間以上であること

6. 製造工程，品質管理

1) 製品の製造には一貫性のある品質管理システムを構築し，製品の均一性を確保する．

2) 製品の製造は厳密に管理された環境下で行なわれ，病原体，有害物質等の混入を防ぐ．

3) 製品の品質確保のために製造ロット毎に規格検定を行なう．

4) 製品の無菌性，無発熱性についても各製造ロット毎に検定を行なう．

7. 倫理的配慮

1) 製品の原料はヒト血液であるため，製品の製造に関わる施設は倫理委員会を組織し，倫理面での管理を徹底する．

2) 細胞，組織，動物を用いた製品の安全性，有効性に関する基礎的検討は，国，ならびに当該施設が定める諸規定に準拠して行なう．

人工酸素運搬体の脳虚血に対する効果

Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Cerebral Ischemia

織田 禎二

Teiji Oda

和文抄録

低い酸素親和性（高い P_{50} ）を有するリポソーム型人工酸素運搬体（LipoHb）の脳虚血に対する効果を3つの実験で検討した。ラット常温及び低体温（22℃）不完全脳虚血モデルにおいて、pretreatmentとして、LipoHb（ P_{50} = 40-50 mmHg, 粒子径=220 nm, Hb= 6 g/dl）を交換輸血（isovolemic hemodilution）にて投与して、虚血・再灌流中の脳エネルギー代謝を ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy（MRS）法にて検討した。常温脳虚血に対して、LipoHbは、特に再灌流後の細胞内pHを有意に早く回復させた。しかし、低体温脳虚血に対しては、その有効性を認めることはできなかった。また、弓部大動脈瘤手術の補助手段として、超低体温循環停止に併用して用いられる逆行性脳灌流の灌流液としてこのLipoHbを応用する実験をラットにて行い、脳組織内高エネルギーリン酸濃度などを検討した。LipoHb液による逆行性灌流は、ラット赤血球液などによる灌流よりも脳虚血による脳組織内高エネルギーリン酸の減少をより小さくする傾向にあった。これらの実験より、高い P_{50} を有するリポソーム型人工酸素運搬体は、脳虚血を軽減する可能性が示唆されたが、今後脳血流に対する影響なども含め、さらに検討が必要である。

ヘモグロビンベースの人工酸素運搬体において、そのoptimal P_{50} は赤血球と同様に正常動脈血ガス分圧では高値をとるが、高度の低酸素血症では低値となると考えられている。最近の研究によると、セルフリー型では、急速な酸素放出に由来する血管収縮を抑制するために P_{50} を小さくして、粒子径を大きくする方法が注目されている。またセルフリー型やリポソーム型において毛細血管や虚血部位に選択的に酸素を到達させる目的で、非常に低い P_{50} を有する酸素運搬体の研究が進行している。人工酸素運搬体のoptimal P_{50} はその粒子径や投与する病態により違ってくると思われる。

Abstract

A liposome-encapsulated hemoglobin (LipoHb) with low oxygen affinity (P_{50} = 40-50 mmHg) has been developed. The purpose of this study was to evaluate the effects of the LipoHb on cerebral ischemia in the following three rat models: (A) nine minutes normothermic incomplete forebrain ischemia, (B) 15 minutes hypothermic (22℃) incomplete forebrain ischemia and (C) retrograde cerebral perfusion (RCP) during hypothermic circulatory arrest (HCA). After pretreatment with LipoHb, normothermic or hypothermic forebrain ischemia was induced by bilateral carotid artery occlusion combined with a decrease in the mean arterial pressure (MAP) to 40 mmHg by blood withdrawal. ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy was performed during ischemia and 60 minutes of reperfusion. After normothermic forebrain ischemia, the pH_i recovery to preischemic levels was significantly more rapid in the LipoHb group than in the RBC group during reperfusion. However, hemodilution with high P_{50} LipoHb did not reduce ischemic energy depletion induced by hypothermic ischemia.

Reportedly RCP provides minimal capillary flow. The hypothesis that optimizing the perfusate composition of RCP would preserve brain energy metabolism during HCA (20℃) was tested. RCP with optimized composition perfusate (pH-stat, hypertonic LipoHb with high P_{50}) reduced ischemic energy depletion during 20 minutes of HCA at 20℃ in rats.

Numerous research works have demonstrated that a high P_{50} of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) or red blood cells is advantageous for normoxia, whereas for severe hypoxia a low P_{50} is advantageous. However, recent studies have revealed that

faster oxygen release from acellular hemoglobin could be disadvantageous because it could lead to regulatory vasoconstriction. HBOCs with Low P_{50} are anticipated to deliver oxygen to capillary vessel or ischemic tissue without any induced autoregulation.

Keywords

blood substitutes; cerebral ischemia; hypothermia; retrograde cerebral perfusion; oxygen affinity; liposome; nitric oxide

1. 研究の背景

ヘモグロビンベースの人工酸素運搬体 (Hemoglobin-based oxygen carriers, HBOCs) は、その研究、開発の発展に伴い、単に輸血用血液の代用としてだけでなく、臓器虚血 (stagnant ischemia) に対しても、治療効果を期待されつつある。ヘモグロビンベースであるため、その単位量当たりの酸素の絶対供給量を増加させることはできないが (ヘモグロビン 1g 当たり酸素 1.39ml を運搬)¹⁾、ヘモグロビンの酸素親和性を低めて、より多くの酸素を放出させる可能性や、酸素運搬体の小さな粒子径による末梢循環 (レオロジー) 改善効果が期待されて、心臓や脳虚血などに対する効果について盛んに研究されてきた^{2,3)}。

心臓血管外科領域において、弓部大動脈瘤手術時の脳保護法として、欧米では、超低体温下循環停止法 (Deep Hypothermic Circulatory Arrest = DHCA) が主流であるが、循環停止時間 40 分以上で脳合併症の増加、65 分以上で死亡率の増加が報告されている⁹⁾。このため、本邦では脳分離体外循環法 (Antegrade Selective Cerebral Perfusion = SCP) や DHCA 法に逆行性脳灌流法 (Retrograde Cerebral perfusion = RCP) を併用する方法が用いられている^{10,12)}。この RCP 法は SCP 法に比べ、簡便な方法ではあるが、静脈から灌流して動脈よりドレナージする方法であるため、capillary perfusion を得る事が難しく¹³⁾、脳組織の好気性代謝へ貢献するものではないと考えられてきた。

しかし、低体温では、赤血球内ヘモグロビンの酸素親和性が強まり、組織に酸素を放出しなくなるため^{14,16)}、また赤血球の変形能も低下して毛細血管を通過できなくなるため¹⁷⁾、赤血球は酸素運搬体として十分に機能しなくなるとされている。このため、超低体温下の RCP 法において、酸素親和性を低く制御した粒子径の小さな人工酸素運搬体 (Liposome-encapsulated hemoglobin = LipoHb) を代用の灌流液として用いれば、不十分な灌流法である RCP 法の酸素運搬能力を高めることができるのではないかとこの着想を得た。このアイデアに対して、1999 年に日本人工臓器学会よりグラントを戴いたため、その後、浜松医大化学教室の研究生として、テルモ研究所の協力を得ながら、研究を行ってきた。本稿では、これまでの研究結果を簡単に紹介しつつ、HBOCs の optimal P_{50} について論じてみたい。

2. 常温脳虚血に対する効果

ラットを pretreatment の有無、違いにより、以下の 3 群に分けた。すわなち、虚血前にテルモ社の開発した LipoHb 液¹⁸⁾ (P_{50} = 40-50 mmHg, 粒子径 = 220nm, Hb = 6 g/dl) 10ml にて交換輸血 (交換率 = 51%) した群 (LipoHb)、同じ Hb 濃度のラット赤血球液で交換輸血した群 (RBC) および無処置群 (Control) に分けた。その後、ラットの不完全脳虚血 (forebrain ischemia)

モデルである、両側頸動脈の一時的遮断と急速脱血による低血圧 (平均血圧で 40mmHg 以下) にて (Fig. 1.)、9 分間の脳虚血及び再灌流を作成し、その間の脳エネルギー代謝を ³¹P-magnetic resonance spectroscopy (MRS) 法で測定した (Fig. 2.)¹⁹⁾。LipoHb 群は RBC 群に比較して有意に血圧が高く、Control 群に比べ高い傾向にあった (Fig. 1.)。3 群とも虚血にて、phosphocreatine (PCr), γ -adenosine triphosphate (γ -ATP) は低下し、再灌流にて回復した。これと逆に inorganic phosphate (Pi) は虚血にて増加し、再灌流にて前値まで減少した。LipoHb 群は他の 2 群に比較して、これらの虚血変化が有意差はないものの小さい傾向にあった。さらに脳組織における細胞内 pH (pHi) は虚血にて急速に低下して再灌流にて回復したが、LipoHb 群は RBC 群よりもその回復が有意に早かった (Fig. 3.)。この pHi の早期回復効果は脳虚血障害軽減の可能性を示唆するものである^{20,21)}。その効果の本体は、LipoHb 群が他の 2 群よりも再灌流早期に血圧が高い傾向にあったことが影響している可能性を否定することはできないが、有意差はなかったものの虚血軽減効果を認めた事 (PCr, ATP, Pi において)、酸素親和性の低い LipoHb は、酸素放出が速いため^{22,23)}、再灌流直後に起きる反応性充血時の速い血流速度、つまり短い通過時間 (transit time) 中に²⁴⁾ RBC よりもより早く多くの酸素を脳組織に供給して酸素負債を解消できた可能性も考慮されるべきである。実際、セルフリーヘモグロビンの in vitro capillary system での実験で

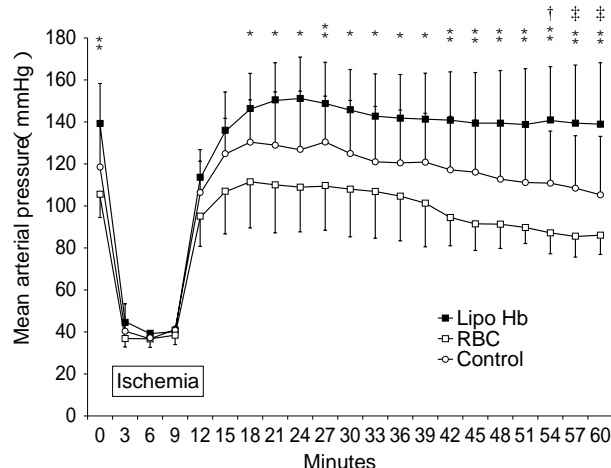


Fig. 1. Mean arterial pressure in the control group and in groups undergoing rat blood cells solution (RBC) or liposome-encapsulated hemoglobin solution (LipoHb) exchange transfusion before forebrain ischemia. Values are mean \pm SD. *P < 0.05 vs. RBC; **P < 0.01 vs RBC; †P < 0.05 vs Control. (from Ref.19)

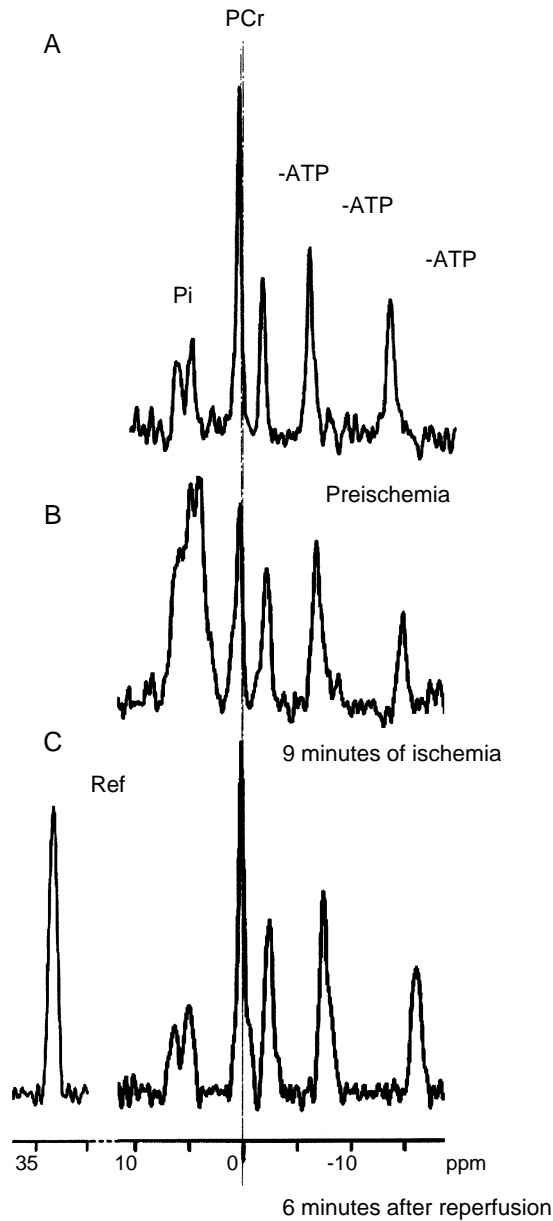


Fig. 2. Representative ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy (^{31}P -MRS) spectra at preischemia (A) 9 minutes of normothermic ischemia (B) 6 minutes after reperfusion (C) obtained from a rat that had undergone LipoHb exchange transfusion before ischemia. During ischemia, the peaks of phosphocreatine (PCr) and γ -adenosine triphosphate (ATP) decreased. The inorganic phosphate (Pi) peak increased and moved to the right. Six minutes after reperfusion (C) all peaks returned to preischemic levels. The distance between the PCr and Pi peaks represents chemical shift. (from Ref.19)

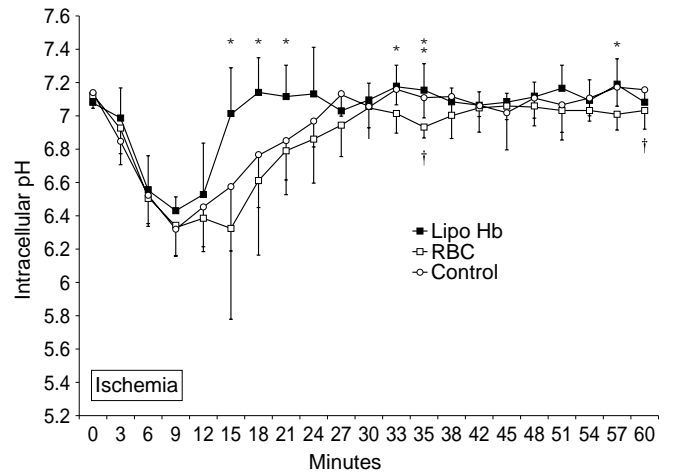


Fig. 3. Changes in intracellular pH during incomplete forebrain ischemia and reperfusion in the control group and in groups that had undergone RBC or LipoHb exchange transfusion before ischemia. Values are means \pm SD. *P < 0.05 vs. RBC; **P < 0.01 vs. RBC; †P < 0.05 vs. Control. (from Ref.19)

は、流速が増加するにつれて、逆に酸素移転総量が低下する事が示された²⁵⁾。また脳組織を使った実験でもある生理的限界を超えて血流速度を増加させても酸素消費量を増加させる程度は小さくなると報告されており²⁶⁾、血流速度が早くなると、単位時間当たりに組織を通過する血液量は多くなるが、その通過に要する時間は短くなるため、それがある限界を越えると、組織への酸素移動の増加が制限される可能性があると考えられた。

このように酸素親和性を低く設定した (P_{50} を高く設定) LipoHbの虚血前投与 (exchange transfusion or isovolemic hemodilution) はラットの常温不完全脳虚血モデルにおいて、脳組織の虚血性アシドーシスを早期に回復させる効果を有していた。しかし、この実験では脳血流量 (CBF) を測定していない事、また虚血前の血圧に群間で有意な差が認められた事、さらに虚血、再灌流障害の最終的帰結について、病理学的及び神経学的検討がなされていない事など、今後に多くの課題を残した。

3. 低温脳虚血に対する効果

常温でのLipoHbの効果が低体温でも認められるかどうかを同様の実験モデルで検討した²⁷⁾。ラットを表面冷却で直腸温22度まで低下させて、同様の不完全脳虚血モデルにて15分間の脳虚血及び再灌流を作成し、 ^{31}P -MRSにて脳エネルギー代謝を測定した。ラットを虚血前に、LipoHbにて同様に交換輸血したLipoHb群と、無処置のControl群の2群に分けて検討した。なお、2群とも、ラットの人工呼吸管理は PaCO_2 を実体温での値に補正せず、40mmHgに維持するようにした (-stat strategy)。

常温で認められたLipoHb群の血圧上昇は認められず、再灌流後、LipoHb群はControl群よりも有意に低い血圧で推移した (Fig. 4.)。虚血によるPcr、 γ -ATPの低下、Piの上昇は常温よりも緩徐で15分の虚血変化は常温での9分の虚血変化よりも軽度

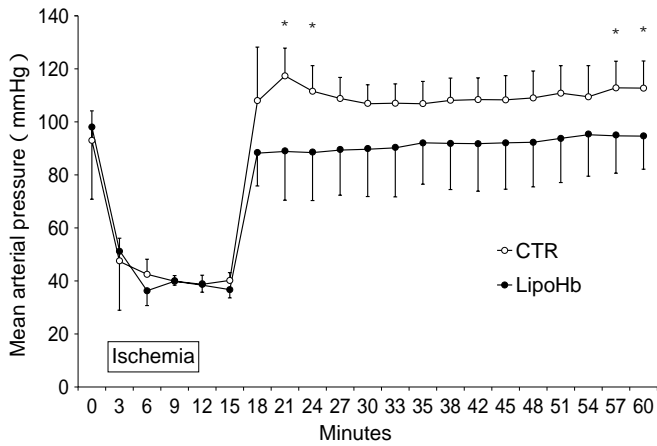


Fig. 4. Mean arterial pressure in the control group and in the group undergoing liposome-encapsulated hemoglobin solution (LipoHb) exchange transfusion before forebrain ischemia. Values are means \pm SD. *P < 0.05. (from Ref.27)

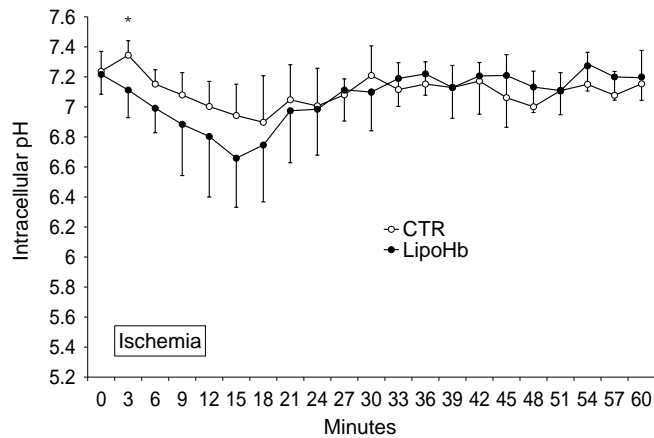


Fig. 6. Changes in intracellular pH during hypothermic incomplete forebrain ischemia and reperfusion in the control group and in group that had undergone LipoHb exchange transfusion before ischemia. Values are means \pm SD. *P < 0.05. (from Ref.27)

であった (Fig. 5). 細胞内pHの低下スピードも常温時に比べ緩徐であった (Fig. 6). LipoHb群は常温時の変化と違って、無処置のControl群よりもやや虚血変化がより大きく、細胞内pHの低下もより大きかった (Fig.6).

脳虚血に対する低体温療法は次第に普及して一般的治療法となりつつあるが^{(28) (29)}、その有効性の一部は低体温による脳組織の酸素消費量抑制効果に基づく^{(28) (30)}。低体温による脳組織酸素消費量 (CMRO₂) の低下率は、一般にQ₁₀によって示される⁽³¹⁾。

$$Q_{10} = (R1/R2)^{10 / (T1-T2)}$$

ここで、R1、R2は体温T1の時の代謝率をR1、同じくT2の時のR2とする。

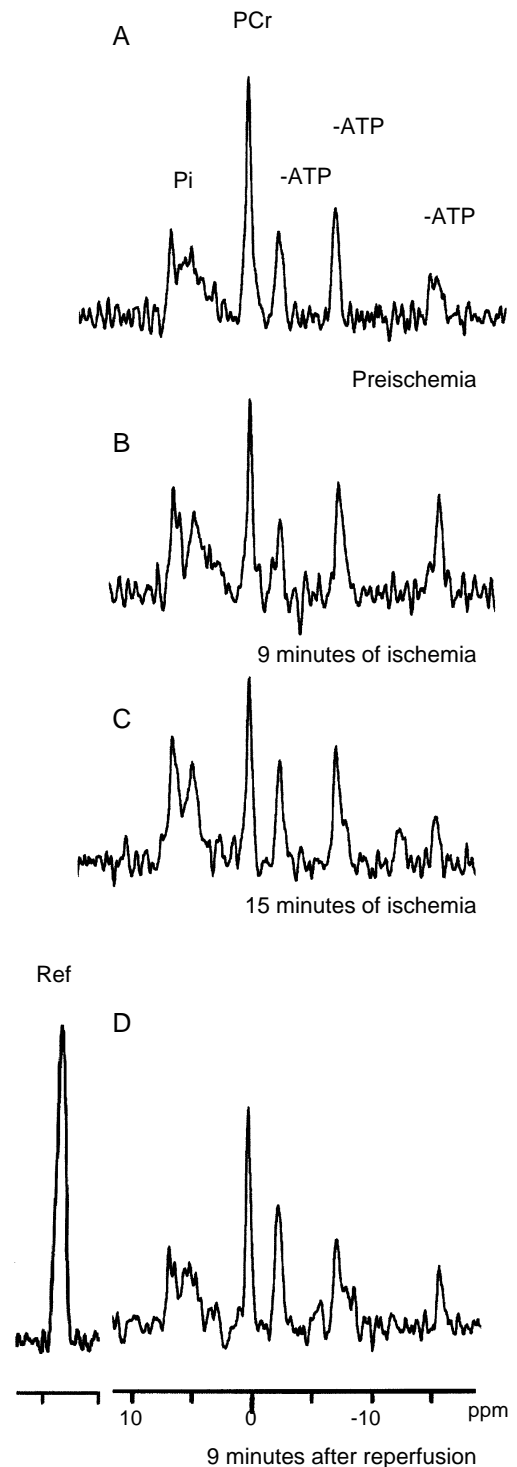


Fig. 5. Representative 31P-magnetic resonance spectroscopy (31P-MRS) spectra at preischemia (A) 9 minutes of hypothermic ischemia (B) 15 minutes of hypothermic ischemia (C) and 6 minutes after reperfusion (D) obtained from a hypothermic (22) rat without pretreatment. During 15 minutes of ischemia, the peaks of phosphocreatine (PCr) and inorganic phosphate (Pi) more gradually decreased or increased than those in normothermia. However, -adenosine triphosphate (-ATP) adversely increased during ischemia. Nine minutes after reperfusion, all peaks returned to preischemic levels. (from Ref.27)

多くの動物において Q_{10} は2前後である³¹⁾。つまり体温が10下がると、代謝率は1/2になる。他方、恒温動物であるヒトは、変温動物と違い、体温の酸素解離曲線に対する影響が大きく、低温ではヘモグロビンの酸素親和性が強くなる。体温低下に伴うヘモグロビンの酸素親和性 (P_{50}) の変化はHill coefficient = 2.8で一定とし、37 °Cでの P_{50} (P_{50}^{37}) を26.8mmHgとすると、一般に以下の式で表現される³¹⁾。

$$\log(P_{50}^T) = \log(P_{50}^{37}) + 0.023(T-37) \quad \text{at pH-stat strategy}$$

$$\text{or } \log(P_{50}^T) = \log(P_{50}^{37}) + 0.03(T-37) \quad \text{at } \text{-stat strategy}$$

ここで、 T は体温 (°C)、 P_{50}^T は T °C での P_{50} 、 P_{50}^{37} は 37 °Cでの P_{50} を示す。この式によると、ヒト赤血球の P_{50} は22 °Cで12.1 mmHg (pH-stat) あるいは 9.5 mmHg (-stat) まで低下する。実際、高度あるいは超低体温人工心肺下では、赤血球の運搬する酸素はその10%程度しか利用されないとされている¹⁶⁾。このような状況に対して、酸素親和性を低く設定したLipoHbは組織への酸素運搬に貢献すると考えられ、低温脳虚血・再灌流障害を軽減すると期待されたが、今回の実験結果はむしろ逆でLipoHb群はコントロール群よりも大きな虚血変化となった。

しかし、この実験では常温虚血実験の時のようなラット赤血球液で交換輸血した群を設定しておらず、LipoHbで交換輸血した群と無処置群が比較されているため、低温 (22 °C) ストレスに追加して加えられたLipoHb液の交換輸血ストレスが、循環動態に与えた負の影響がその後の脳虚血を強める方向に作用した可能性を否定することはできない。しかしながら、中等度低温 (27 °C) 人工心肺下の実験においても、セルフフリーヘモグロビンの投与は脳の酸素消費を増加させることができず⁷⁾、また軽度低温 (34 °C) によるヘモグロビンの酸素親和性増強を薬理的に弱めた実験において、focal ischemiaを軽減する効果が認められなかったとの実験報告もあり³²⁾、低温脳虚血におけるHBOCsの効果やoptimal P_{50} について今後さらなる検討が必要と思われる。

常温ではLipoHb投与後、有意に血圧が上昇したが、低温では、そのような血圧上昇は認められなかった。LipoHb液やラット赤血球液及びラット全血の常温と低温での血液粘性について全く測定を行っていないため、また詳細な血行動態に関するパラメーターを測定していないため、この違いが、どのようなメカニズムによるものか不明である。しかし、赤血球の酸素親和性修飾やHBOCs投与により、酸素運搬能が向上すると、それに対する生体側の反応が起きて (regulatory autoregulation)、末梢血管抵抗が増加するため、それにより、常温では、LipoHb投与により脳虚血は軽減され、血圧が上昇したが、低温では、何らかの原因により、LipoHb投与による酸素運搬能の増加がおきず、そのため、虚血軽減効果も血圧上昇も生じなかったと考え得る。

4. 逆行性脳灌流における効果

高度低温下循環停止において、脳保護のための補助手段としての逆行性脳灌流併用の有無とその灌流液の違いによりラットを以下の4群に分けた³³⁾。すなわち、(1) 生理食塩水ベース灌流液による灌流群 (RCP-Saline)、(2) ラット赤血球ベース灌流液 (Hb = 6 g/dl) による灌流群 (RCP-RBC)、(3) LipoHbベース灌流液による灌流群 (RCP-LipoHb)、(4) 逆行性灌流なし群 (低温循環停止 = HCA) とした。ラットを表面冷却にて20 °Cまで冷却し、KCL注入にて心停止とし、逆行性脳灌流群では、直ちに右頸静脈より、逆行性に各灌流液の灌流を開始し、大動脈を切開してドレナージした (Fig. 7. A,B)。流量は左頸静脈圧が25-30mmHgとなるようにコントロールした。

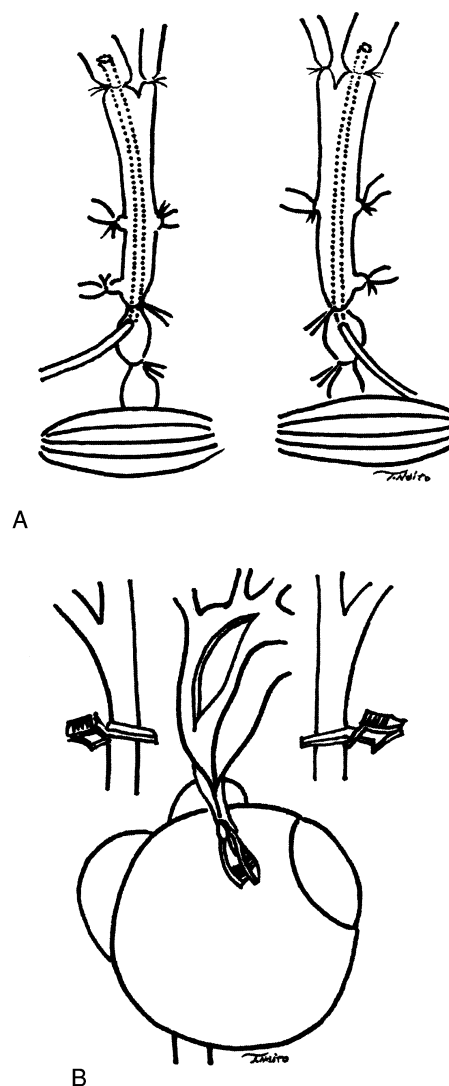


Fig. 7. Schematic diagram of rat preparation. Bilateral maxillary veins were cannulated for perfusion and pressure monitoring (A) Two cranial vena cava, ascending aorta and pulmonary artery were clamped (B) After circulatory arrest, perfusate was retrogradely infused via the right maxillary vein, regulating the flow to maintain a pressure of 25 to 30 mmHg in the left maxillary vein. The effluent was collected at the incised aortic arch (B) (from Ref.33)

HCA群では、循環停止のままとした。すべての群において、ラットの人工呼吸管理でのPaCO₂は、実体温での値に補正して、40mmHgを維持するように炭酸ガスを付加した（pH-stat strategy）。また各灌流液は酸素とともに炭酸ガスも付加して、同様に炭酸ガス分圧を維持した。また高い静脈圧による脳浮腫を予防するため、各灌流液は高浸透圧液（約360 mosmol/KgH₂O）とした。

20分間の循環停止および逆行性脳灌流の後、直ちに脳組織を採取して、液体窒素中に保存して、脳組織内高エネルギーリン酸をhigh-performance liquid chromatography (HPLC) 法にて測定し、Energy charge (EC, $EC = \frac{(ATP) + 1/2 (ADP)}{(ATP) + (ADP) + (AMP)}$) を計算した³⁴⁾。

上記4群のECを比較すると、RCP-LipoHb群とRCP-RBC群はRCP-Saline群やHCA群に比べて有意に高いECを示した (Fig. 8)。また、RCP-LipoHb群は有意ではないものの、RCP-RBC群よりも高いECを示した。今回の実験では、脳組織を採取する前にflushingを行っていないため、RCP-RBC群では、脳血管内のRBC中ATPも一緒に測定して、実際の脳組織の値よりも高い測定値となった可能性がある。酸素親和性を低く設定した（高いP₅₀を有する）LipoHbを灌流液とする事によって、超低体温下逆行性脳灌流法はその有効性を高める可能性が示唆された。今後、より臨床的なモデルを用いて、その有効性を確認する必要がある。

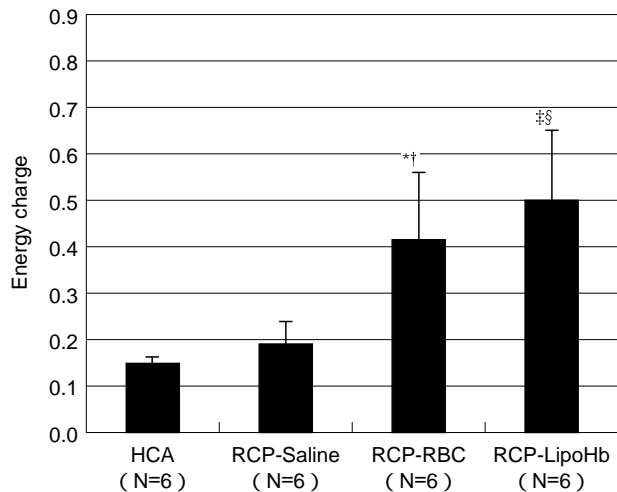


Fig. 8. Brain energy charge (EC) depletion after 20 minutes of hypothermic circulatory arrest (HCA), or retrograde cerebral perfusion (RCP). RCP with Liposome-encapsulated hemoglobin solution (RCP-LipoHb) or rat red blood cells solution (RCP-RBC) effectively preserved EC. RCP with saline solution (RCP-Saline) failed to maintain EC. Both HCA and RCP-Saline resulted in almost complete loss of EC. All values are shown as the means with standard deviations. P values are based 1-way analysis of variance with Dunnett or Tukey-Kramer post hoc analysis. *P = 0.0270 versus RCP-Saline; †P = 0.0022 versus HCA; ‡P = 0.0030 versus RCP-Saline; §P = 0.0001 versus HCA (from Ref.33)

5. P₅₀に関する研究動向について

(1) 赤血球中ヘモグロビンのP₅₀に関する知見

ヘモグロビンの酸素解離曲線は、一般にそのP₅₀値と cooperativity (Hill coefficient) によって表現される。赤血球内ヘモグロビンのP₅₀をallosteric modifierで高くあるいは低く制御することの影響について多くの研究がなされている³⁵⁾⁴³⁾。これらを総合すると、PaO₂が正常あるいは軽度低下の場合は、P₅₀を高くすることによって酸素運搬能は高まる事が期待され³⁷⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁴²⁾⁴³⁾、臓器虚血モデルにおいても、虚血軽減効果を認め^た³⁵⁾³⁷⁾。ただし、高度の低酸素血症の場合は、肺での酸素化において、低い酸素分圧でもヘモグロビンの酸素飽和度を高く維持できるため、P₅₀を低く設定した方が有利である³⁸⁾⁴¹⁾。しかしながら、これらヘモグロビンの酸素親和性の変化は生体側の反応末梢血管抵抗、臓器血流量、心拍出量などの変化を引き起こすため、その効果はある程度以上相殺される³⁸⁾³⁹⁾⁴¹⁾⁴⁴⁾⁴⁷⁾。赤血球の酸素親和性を低く制御した場合（P₅₀を高く制御した場合）は、それによって組織の酸素需要を上回る oxygen delivery となるため、それを制限する生体側の negative feedback process が働き⁴⁵⁾⁴⁷⁾、その制御によって酸素消費量はコントロール群と同じレベルに維持されていた⁴⁵⁾。しかし何らかの病的状態で、臓器・組織血流量が制限されている状況では、そのような反応を生じず、高いP₅₀の効果がそのまま発揮される可能性があると思われる⁴⁷⁾。反対に赤血球の酸素親和性を増加させた場合（P₅₀を低下させた場合）は、これとは逆に oxygen delivery の低下をもたらすため、心拍出量の増加と、心、脳などの酸素需要の多い臓器の臓器血流量増加をもたらす代償作用が働くことが示された³⁸⁾⁴¹⁾。このように赤血球の酸素運搬機能は循環の制御と深く連動し、1つのシステムとして機能しているため、このシステムの中から1つのエレメントだけを取り出して分析しても、システムの全体像を得る事はできないと思われる。

一方、ヘモグロビンの酸素解離曲線の経験式である Hill equation ($S = \frac{PO_2^n}{(PO_2^n + P_{50}^n)}$) より、所与の動脈血及び静脈血酸素分圧において、動静脈血酸素飽和度較差を最大にするP₅₀をoptimal P₅₀とすると、以下の式で表現される⁴⁴⁾。

$$\text{optimum } P_{50} = (\text{PaO}_2 \times \text{PvO}_2)^{1/2}$$

また、所与の動脈血酸素飽和度及び動静脈血酸素飽和度較差において、PvO₂を最大にするP₅₀をoptimal P₅₀とすると、以下の式で表現される。

$$\text{optimum } P_{50} = \text{PaO}_2 \left\{ \frac{1 + (\text{SaO}_2 - \text{SvO}_2)}{1 + (\text{SaO}_2 - \text{SvO}_2)^{1/n}} \right\}^{1/n}$$

ここで、PaO₂は動脈血酸素分圧、SaO₂は動脈血酸素飽和度、SvO₂は（混合）静脈血酸素飽和度、nはHill coefficientを示す。この式より、PaO₂が低い場合（hypoxia）及びPvO₂が低い病態あるいは動静脈血酸素飽和度較差が増加した病態（酸素消費量/酸素運搬量比の高い状態：酸素需要の亢進状態、高度貧血な

ど)はoptimal P_{50} が低下することが容易に理解される。

(2) HBOCsにおけるヘモグロビンの P_{50} に関する知見

理論的枠組みとしては、HBOCs (実際はHBOCs-RBCs mixtureとして存在)のoptimal P_{50} も、赤血球の場合とほぼ同様に考えられる⁴⁸⁾。高度のhypoxiaでは、 P_{50} を低く設定する必要があるが、一般的には P_{50} を高くすれば、他の条件に変化がない限り、 PvO_2 をより高く維持することができる⁴⁸⁾。しかし、単位血液量当たりのoxygen deliveryが増加すると、赤血球の場合と恐らく同様のメカニズムで、それに対する生体側の反応 (autoregulation) - vasoconstriction, functional capillary densityの減少など^{22), 49), 50)} が起きるため、これらをすべて考慮してHBOCsの設計を行なう必要があり、またその評価は循環システム全体を視野に入れたものでなければならないと思われる。

このような生体側の反応を抑制する目的で、最近の研究の方向として、高酸素親和性 (低い P_{50}) のHBOCsの有効性が注目されている。その投与が有効な病態としては、Hypoxia (hypoxic hypoxia)^{51), 52)} や高度貧血 (anemic hypoxia)⁵⁰⁾ が報告されている。臓器虚血 (stagnant ischemia) は一般に、temporary / permanent, complete / incomplete, global / focal に分類される⁵³⁾。permanentでcompleteな虚血にはどのようなHBOCsも無効となるが、temporaryであれば、再灌流時早期のhyperemiaやdelayed hypoperfusionの時期に⁵⁴⁾、incomplete or focal ischemiaであれば虚血中にHBOCsが効果を発揮しうる。一般に虚血 (stagnant hypoxia) 時は血流速度が遅くなり、通過時間 (transit time) が長くなるが⁵⁵⁾、Sakaiらは、超高酸素親和性LipoHbの酸素放出スピードの遅さに着目して、hamster skin flap modelを用いて、細動脈完全閉塞後約30秒間、高酸素親和性LipoHbが細動脈内で酸素をゆっくり放出し続けることを確認したが⁵⁶⁾、この研究は小範囲のfocal ischemia - 例えば小さな脳梗塞 (ラクナ梗塞) あるいは“cerebral small vessel disease”⁵⁷⁾ - の治療への応用などに期待を抱かせる。

HBOCsの粒子径の違いが拡散に与える影響 (Stokes-Einstein equation) から、セルフリー・ヘモグロビンは“facilitated diffusion”による速い酸素放出が起きる^{23), 25), 58)}。この事が、autoregulationによる血管収縮を引き起こしているのではないかと仮説により、これを抑制するため、低めの P_{50} が提唱されている^{22), 25), 49), 50)}。Tsaiらは、セルフリー・ヘモグロビンの速い酸素放出を抑制するため、PEG化により粒子を大型化したultra-low P_{50} (5.4mmHg) のセルフリー・ヘモグロビン (MP4) を作成し、polymerized bovine hemoglobin (PolyBvHb) ($P_{50}=54.2\text{mmHg}$) との比較をハムスターのskinfold modelで行なった。なお、これらのHBOCsの交換輸血の前に、高度の血液希釈が行なわれた ($Ht=11\%$)。MP4はPolyBvHbに比べて、酸素運搬総量は少なかったものの (O_2 extraction ratioで、MP4が0.93に対して、PolyBvHbが1.00)、precapillary vesselでの酸素放出は少なく、capillary vesselでの酸素放出が多かった。同時に、MP4投与群は、base excessがよりプラスに傾いてい

たことより、tissue oxygenationにおいて、より優れていたと結論している。しかしながら、嫌気性代謝の厳密な診断はbase excessではなく、乳酸値を測定し、その動静脈血含量較差あるいはlactate / pyruvate ratio、さらに臓器によっては“excess lactate”を測定、計算して判断すべきである⁵⁹⁾、実験条件である高度の血液希釈とroom airでの呼吸は、 P_{50} の低い酸素運搬体に有利である。また、このMP4はこの実験条件のような極めて高度の貧血状態では有効かもしれないが、通常のHtレベルでは、それ以上の低下で組織の酸素消費量の低下が起きる最低の PvO_2 とされるcritical PvO_2 (通常、37 でのcritical mixed venous oxygen tension は20mmHg)³¹⁾ よりもはるかに低い P_{50} を有するため、正常組織中ではほとんど酸素を放出しないと思われる。因みにこのcritical PvO_2 は骨格筋 (弛緩時): 25mmHg、骨格筋 (収縮時): 10mmHg、脳 (normocapnia): 13mmHg、脳 (hypercapnia): 9mmHg、肝: 24mmHg、skin flap: 10mmHgとの実験データが報告されている^{8), 60)}。

また、この論文の考察の中で、著者らはprecapillary vesselでの酸素放出を“ O_2 loss”であると述べている。この酸素の“ロス”という表現には、血管壁より周囲組織に酸素が拡散して消費 (呼吸) されるよりも、血管壁による“無駄な”酸素消費が多い (?) という意味が込められていると思われる。しかし、そのようなコメントに対して二つの疑問を抱かざるを得ない。まず第1の疑問は、precapillary vesselレベルでの酸素放出の生理的意義についてである。正常に機能している微小循環においても、赤血球は動脈血中に含む酸素の1/3あるいは、全酸素放出量の2/3を毛細血管に到達する前に (precapillary vesselより)、周囲の組織あるいは毛細血管に放出しており^{61), 62)}、従って、この酸素放出は何らかの生理的意義を有しているはずである。Tsai等の実験では、MP4を投与された群では、1/3の酸素がprecapillary vessel、2/3がcapillary vesselより放出されており、恐らく正常状態よりもcapillary vesselよりの酸素放出の比重が大きいと推定される。しかし、それが果たして生理的状态より優れた酸素放出なのかどうかについて、この実験では十分な根拠が示されていない。precapillary vesselからであろうと、capillary vesselからであろうと、放出された酸素がともに組織の酸素消費 (呼吸) に利用されたのであれば、両者は等価であるはずであり、その点 (最終的な酸素の利用法) の解明が今後の課題と思われる。第2の疑問は、血管壁で消費される酸素の生理的意義についてである。“ O_2 loss”と表現されているこの血管壁での酸素消費には、血管壁内の内皮細胞や平滑筋細胞内のミトコンドリアで消費 (呼吸) される部分 (V_{mt}) とNO産生に利用される部分 (V_{no}) などがある⁶³⁾。NOは組織の酸素消費量 (V_{mt}) を可逆的に減少させるため^{64), 65)}、その産生増加は組織の酸素消費量 (V_{mt}) を減少させ、それによって心臓などの組織の虚血耐性を増加させる⁶⁶⁾。そのメカニズムは、pharmacological preconditioningと関連していることが広範な研究から判明している^{66), 68)}。また、NOによる組織の酸素消費量 (V_{mt}) の減少は、血管のより周辺組織まで酸素を到達させる効果を期待させる⁶⁵⁾。高気圧酸素により酸素のavailabilityが増

加するとNOの産生が増加することが報告されているが⁶⁹⁾, HBOCs投与により酸素のavailabilityを高めることで同様にNO産生増加が起きるのであれば, 上記のprecapillary vesselでの酸素消費(血管壁によるVmt + Vno及び周囲組織によるVmtの総計)の増加は, Vnoの増加を伴っているはずである. 従って, NOの産生増加により組織や血管壁のVmtの減少を引き起こしている可能性があり, これらの可能性をヘモグロビンによるNOのスキャベンジと同時に考慮すべきである. このような観点では, HBOCsの評価は, 単に酸素の供給のみでなく, その消費も含めて総合的に行なわれなければならない. なお, このようなセルフリー・ヘモグロビンの速い酸素授受は, 粒子径のより大きなLipoHbでは, 認められなかった²³⁾.

6. まとめ

低酸素親和性(高い P_{50}) LipoHbは常温不完全脳虚血や弓部大動脈瘤手術時の補助手段である超低体温循環停止下逆行性脳灌流の灌流液として有用である可能性があり, 今後脳血流に対する影響を含め検討が必要である. しかし高度低体温脳虚血に対しては有効性を認めることができなかった. 今後この分野の研究の発展が望まれる.

HBOCsのoptimal P_{50} は一般にその粒子径によって, また投与する病態により変わると思われる. HBOCs投与による生体側の反応も考慮して改良を図ることで, より有効性の高いものを作ることができると考えられる. また, その最終評価は単に組織・臓器への酸素供給を個々のエレメントに限定して分析するだけでなく, そのシステム全体を分析対象にする必要があり, さらに酸素供給の変化が組織・臓器の酸素消費に与える影響も含めて検討する, より総合的な評価(エネルギー代謝や生体機能の維持など)が将来的な課題になると予想される.

参考文献

1. 諏訪邦夫. 血液ガスの臨床. 東京: 中外医学社, 1981.
2. Cole DJ, Schell RM, Przybelski RJ, Drummond JC, Bradley K. Focal cerebral ischemia in rats: effect of hemodilution with alpha-alpha cross-linked hemoglobin on CBF. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1992;12:971-976.
3. Bowes MP, Burhop KE, Zivin JA. Diaspirin cross-linked hemoglobin improves neurological outcome following reversible but not irreversible CNS ischemia in rabbits. *Stroke* 1994;25:2253-2257.
4. Cole DJ, Schell RM, Drummond JC, Przybelski RJ, Marcantonio S. Focal cerebral ischemia in rats: effect of hemodilution with alpha-alpha cross-linked hemoglobin on brain injury and edema. *Can J Neurol Sci* 1993;20:30-36.
5. Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H, Hacke W, Kaste M, Przybelski RJ, Stern KN, Koudstaal PJ. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:993-996.
6. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A.

Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. *Adv Exp Med Biol* 1999;471:27-33.

7. Hindman BJ, Dexter F, Cutkomp J, Smith T. Diaspirin cross-linked hemoglobin does not increase brain oxygen consumption during hypothermic cardiopulmonary bypass in rabbits. *Anesthesiology* 1995;83:1302-1311.
8. Erni D, Wettstein R, Schramm S, Contaldo C, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A. Normovolemic hemodilution with Hb vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1703-H1709.
9. Svensson LG, Craford ES, Hess KR, et al. Deep hypothermia with circulatory arrest: Determinants of stroke and early mortality in 656 patients. *J Thorac Cradiovasc Surg* 1993;106: 19-31.
10. Ueda Y, Miki S, Kusuhara K, Okita Y, Tahata T, Yamanaka K. Surgical treatment of aneurysm or dissection involving the ascending aorta and aortic arch, utilizing circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion. *J Cardiovasc Surg*. 1990;31:553-558.
11. Coselli JS, LeMaire SA. Experience with retrograde cerebral perfusion during proximal aortic surgery in 290 patients. *J Card Surg* 1997;12:322-325.
12. Okita Y, Minatoya K, Tagusari O, Ando M, Nagatsuka K, Kitamura S. Prospective comparative study of brain protection in total aortic arch replacement: deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion or selective antegrade cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg* 2001;72:72-79.
13. Ehrlich MP, Hagl C, McCullough JN, Zhang N, Shiang H, Bodian C, Griep RB. Retrograde cerebral perfusion provides negligible flow through brain capillaries in the pig. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:331-338.
14. Dexter F, Kern FH, Hindman BJ, Greeley WJ. The brain uses mostly dissolved oxygen during profoundly hypothermic cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1725-9.
15. Holman WL, Spruell RD, Digerness SB, Dudelston J, Pacifico AD. Oxyhemoglobin dissociation during hypothermic blood cardioplegia arrest. *Circulation* 1992;86 (Suppl II)II-339-II-345.
16. Dexter F, Hindman BJ. Theoretical analysis of cerebral venous blood hemoglobin oxygen saturation as an index of cerebral oxygenation during hypothermic cardiopulmonary bypass. A counterproposal to the "luxury perfusion" hypothesis. *Anesthesiology* 1995;83:405-412.
17. Kameneva MV, Undar A, Antaki JF, Watach MJ, Calhoon

- JH, Borovetz HS. Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass. *ASAIO J* 1999;45:307-10.
18. Ogata Y, Goto H, Kimura T, Fukui H. Development of Neo Red Cells(NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech* 1997;25:417-427.
 19. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen-affinity hemoglobin facilitates rapid recovery from ischemic acidosis after cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs* 2004;7:101-106.
 20. Nishijima MK, Koehler RC, Hurn PD, Eleff SM, Norris S, Jacobus WE, Traystman RJ. Postischemic recovery rate of cerebral ATP, phosphocreatine, pH and evoked potentials. *Am J Physiol* 1989;257:H1860-H1870.
 21. Maruki Y, Koehler RC, Eleff SM, Traystman RJ. Intracellular pH during reperfusion influences evoked potential recovery after complete cerebral ischemia. *Stroke* 1993;24:697-703.
 22. Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O₂ affinity. *Am J Physiol(Heart Circ. Physiol)* 1999;276:H553-H56254.
 23. Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, Takeoka S, Maeda N, Tsuchida E. O₂ release from Hb vesicle evaluated using an artificial, narrow O₂-permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2543-H2551.
 24. Hamberg LM, Macfarlane R, Tasdemiroglu E, Boccalini P, Hunter GJ, Belliveau JW, Moskowitz MA, Rosen BR. Measurement of cerebrovascular changes in cats after transient ischemia using dynamic magnetic resonance imaging. *Stroke* 1993;24:444-451.
 25. McCarthy MR, Vandegriff KD, Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 2001;92:103-117.
 26. Ivanov KP, Kislaykov YY, Samoilov MO. Microcirculation and transport of oxygen to neurons of the brain. *Microvasc Res* 1979;18:434-441.
 27. Oda T, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen-affinity hemoglobin does not attenuate hypothermic cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs*. In press.
 28. Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke. What do laboratory studies teach us? *Stroke* 2004;35:1482-1489.
 29. Danton GH, Dietrich WD. The search for neuroprotective strategies in stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25:181-194.
 30. Norwood WI, Norwood CR, Ingwall JS, Castaneda AR, Fossel ET. Hypothermic circulatory arrest. 31-phosphorus nuclear magnetic resonance of isolated perfused neonatal rat brain. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979;78:823-830.
 31. Willford DC, Hill EP, Moores WY. Theoretical analysis of oxygen transport during hypothermia. *J Clin Monit* 1986;2:30-43.
 32. Wainwright MS, Sheng H, Sato Y, Mackensen B, Steffen RP, Pearlstein RD, Warner DS. Pharmacological correction of hypothermic P₅₀ shift does not alter outcome from focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1863-H1870.
 33. Oda T, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Optimized retrograde cerebral perfusion reduces ischemic energy depletion. *J Artif Organs* 2004;7:19-26.
 34. Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968;7:4030-4034.
 35. Grocott HP, Bart RD, Sheng H, Miura Y, Steffen R, Pearlstein RD, Warner DS. Effects of a synthetic allosteric modifier of hemoglobin oxygen affinity on outcome from global cerebral ischemia in the rat. *Stroke* 1998;29:1650-1655.
 36. Watson JC, Doppenberg EMR, Bullock MR, Zauner A, Rice MR, Abraham D, Young HF. Effects of the allosteric modification of hemoglobin on brain oxygen and infarct size in a feline model of stroke. *Stroke* 1997;28:1624-1630.
 37. Kimura H, Hamasaki N, Yamamoto M, Tomonaga M. Circulation of red blood cells having high levels of 2,3-bisphosphoglycerate protects rat brain from ischemic metabolic changes during hemodilution. *Stroke* 1995;26:1431-1437.
 38. Turek Z, Kreuzer F, Turek-Maischeider M, Ringnald BEM. Blood O₂ content, cardiac output, and flow to organs at several levels of oxygenation in rats with a left-shifted blood oxygen dissociation curve. *Pflugers Arch* 1978;376:201-207.
 39. Stucker O, Vicaut E, Villereal MC, Ropars C, Teisseire BP, Duvelleroy MA. Coronary response to large decreases of hemoglobin-O₂ affinity in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1985;249(Heart Circ Physiol 18)H1224-H1227.
 40. Cornum RL, Martin R, Bandy WC. Transfusion of phosphoenolpyruvate-treated blood increases oxygen consumption in acute hemorrhage. *Am J Surg* 1998;175:469-471.

41. Woodson RD, Auerbach S. Effect of increased oxygen affinity and anemia on cardiac output and its distribution. *J Appl Physiol* 1982;53:1299-1306.
42. Khandelwal SR, Randad RS, Lin P-S, Meng H, Pittman RN, Konto Khandelwal SR, Randad RS, Lin P-S, Meng H, Pittman RN, Kontos HA, Choi SC, Abraham DJ, Schmidt-Ullrich R. Enhanced oxygenation in vivo by allosteric inhibitors of hemoglobin saturation. *Am J Physiol(Heart Circ Physiol)* 1993;265:H1450-H145345.
43. Matsuzaki K, Takano H, Tokunaga K, Inaba S, Hamasaki N. Clinical application of phosphoenolpyruvate(PEP) to autologous transfusion of patients with open heart surgery. *Fukuoka Acta Med* 1993;84:7-14.
44. Willford DC, Hill EP, Moores WY. Theoretical analysis of optimal P_{50} . *J Appl Physiol* 1982;52:1043-1048.
45. Liard JF, Kunert MP. Hemodynamic changes induced by low blood oxygen affinity in dogs. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 1993;264:R396-R401.
46. Teisseire B, Ropars C, Villereal M-C, Nicolau C. Long-term physiological effects of enhanced O_2 release by inositol hexaphosphate-loaded erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6894-6898.
47. Kunert MP, Liard JF, Abraham DJ, Lombard JH. Low-affinity hemoglobin increases tissue pO_2 and decreases arteriolar diameter and flow in the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 1996;52:58-68.
48. Kavdia M, Pittman RN, Popel AS. Theoretical analysis of effects of blood substitute affinity and cooperativity on organ oxygen transport. *J Appl Physiol* 2002;93:2122-2128.
49. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-516.
50. Tsai AG, Vandegriff KD, Intaglietta M, Winslow RM. Targeted O_2 delivery by low- P_{50} hemoglobin: a new basis for O_2 therapeutics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1411-H1419.
51. Contaldo C, Schramm Soren, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leuning M, Banic A, Erni D. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O_2 affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1140-H1147.
52. Baines AD, Ho P. O_2 affinity of cross-linked hemoglobins modifies O_2 metabolism in proximal tubules. *J Appl Physiol* 2003;95:563-570.
53. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989;20:1627-1642.
54. Kagstrom E, Smith M-L, Siesjo BK. Recirculation in the rat brain following incomplete ischemia. *J Cerebral Blood flow Metab* 1983;3:183-192.
55. Lin SZ, Chiou TL, Song WS, Chiang YH. Isovolemic hemodilution normalizes the prolonged passage of red cells and plasma through cerebral microvessels in the partially ischemic forebrain of rats. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1996;16:280-289.
56. Sakai H, Cabrales P, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen release from low and normal P_{50} Hb-vesicles in transiently occluded arterioles of the hamster window model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;228:H2897-H2903.
57. Schmidtke K, Hull M. Cerebral small vessel disease: how it progress? *J Neurol Sci* 2005;229-230:13-20.
58. Page TC, Light WR, McKay CB, Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res* 1998;55:54-64
59. Huckabee WE. Relationship of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. V: coronary adequacy. *Am J Physiol* 1961;200:1169-1176.
60. 宮本顕二, 川上義和. 多臓器障害からみた基準(特集 酸素療法の適応基準) 呼と循. 1988;36:499-507.
61. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res*. 1996;32:632-643.
62. Pittman RN. Influence of microvascular architecture on oxygen exchange in skeletal muscle. *Microcirculation* 1995;2:1-18.
63. Vadapalli A, Pittman RN, Popel AS. Estimating oxygen transport resistance of the microvascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:657-671. 5
64. Barron JT, Gu L, Parrillo JE. Endothelial- and nitric oxide-dependent effects on oxidative metabolism of intact artery. *Biochim Biophys Acta* 2001;1506:204-211.
65. Lamkin-Kennard KA, Buerk DG, Jaron D. Interactions between NO and O_2 in the microcirculation: a mathematical model. *Microvasc Res* 2004;68:38-50.
66. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61:402-413.
67. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 1. *Circulation* 2001;104:2981-2989.
68. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 2. *Circulation* 2001;104:3158-3167.
69. Thom SR, Fisher D, Zhang J, Bhopale VM, Ohnishi ST, Kotake Y, Ohnishi T, Buerk DG. Stimulation of perivascular nitric oxide synthesis by oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1230-H1239.

P₅₀ 値の低いヘモグロビンによる酸素ターゲティング： 酸素治療の新しい原理

Targeted O₂ Delivery by Low-P₅₀ Hemoglobin: a New Basis for O₂ Therapeutics

Amy G. Tsai⁽¹⁾, Kim D. Vandegriff⁽²⁾, Marcos Intaglietta⁽¹⁾, & Robert M. Winslow^(1,2).

(訳者) 酒井 宏水・土田 英俊*
Hiromi Sakai, Eishun Tsuchida

訳者のコメント

ヒト赤血球の酸素親和度 (P₅₀: 酸素が50%結合飽和するときの酸素分圧) は、37 °C で約28 Torrである。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧 (110 Torr) と静脈血酸素分圧 (40 Torr) の間の酸素飽和度較差 (A-V較差、ヒト赤血球の場合は25%程度) とHb濃度、それに心拍出量の積として算出される。

さて、赤血球から精製単離したHbのP₅₀は8 Torr程度と低く、静脈血酸素分圧 (40 Torr) では到底酸素を放出しないので、Hbを利用する人工酸素運搬体のP₅₀も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと極めて明快に考えられてきた。しかし、Hb (約5 nm径) は赤血球 (8 μm) に比べ極めて小さいので、酸素結合-解離が赤血球より極めて速いことがStopped-flow法による動的スペクトルから確認された^{1,2)}。また、赤血球は微小血管の中心側を流れ、管壁近傍に形成される血漿層が酸素拡散の障壁となるのとは対照的に、Hb分子は血漿層に均一分散し血管壁近傍を流れるので、組織により酸素を放出し易い状態にある。Hb分子の拡散による酸素の促進輸送効果も確認されている³⁻⁶⁾。酸素供給過多は微小循環悪化の原因ともなるので^{7,8)}、Hb分子の酸素放出速度と流動様式が赤血球と異なるのであれば、分子状Hbの最適P₅₀は必ずしも赤血球と同じが良いとは言えないのかもしれない。

今回ここに紹介するDr. Tsaiら、San Diego一派の論文は、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾したヒトHb (MP4,

Hemospan, Sangart社製) の微小循環系における酸素輸送量を評価した内容である。P₅₀が僅か5.3 Torrであるが、対照溶液として用いた重合ウシHb (P₅₀ = 54.2 Torr, Oxyglobin, Biopure社製) よりも微小循環系において優れた酸素運搬効果を示している。最適P₅₀値を再考する上で参考となる論文と思われるが、デキストラン溶液で極度の血液希釈をした後の更なる血液交換にHb溶液を投与しているの、全体的にかなり低酸素状態に陥った場合の特殊な環境下で導き出された結論と思われる。その意味では、輸血代替としての利用以外の酸素治療剤としての適応症、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングに適しているのかもしれない⁹⁾。PEG修飾Hbは輸血代替として臨床試験がスウェーデンで順調に進行していると聞くが、膠質浸透圧を低減するためにHb濃度が僅か4.2g/dLでP₅₀値も極端に小さいのに、正常組織に酸素運搬をする場合に果たしてどの程度酸素輸送に寄与するのか疑問も残る。しかし、PEG修飾アルブミンとの比較試験の結果、十分な酸素運搬効果があると最近報告している¹⁰⁾。

他方、日本で進展しているカプセル型のHb小胞体は、その酸素親和度 (P₅₀) をアロステリック因子により自在に調節出来るので¹¹⁾、各々の適応に相応しいP₅₀を有するテイラーメイド人工赤血球が可能に成る筈である^{12,16)}。

(1) Department of Bioengineering, University of California, San Diego

(2) Sangart Inc.

* 早稲田大学 理工学総合研究センター 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

論文受付 2005年3月8日 受理 2005年5月23日

尚、図表は著作権の問題があるので割愛するが、内容は文章から十分に理解できると思われる。興味ある方は原著を一読して頂きたい。

要 旨

新しい酸素運搬体、表面PEG修飾ヒトHb [MP4; 50%飽和 PO_2 (P_{50}) 5.4mmHg] による組織への酸素輸送の評価を目的とした。Golden Syrian ハムスターを用い、MP4または重合ウシHb (PolyBvHb; P_{50} 54.2 mmHg) にて血液希釈した際の微小循環動態および酸素放出を検討した。比較として血漿増量剤 (デキストラン70) による血液希釈も実施した。全身循環動態 (動脈血圧及び心拍数) 及び酸塩基パラメータの変動は、微小循環動態 (血管径、赤血球速度、及び流動性) と相関は無かった。末梢組織酸素分圧と酸素飽和度の顕微鏡的観察から、赤血球と血漿Hb (MP4またはPolyBvHb) 各々について、毛細血管に流入する手前の血管 (precapillary) と毛細血管内における酸素放出量を解析した。細動脈の直径、流動性、流速は、動物群間で有意な差を認めなかったが、有効毛細血管密度はMP4群 (67%) で、PolyBvHb群 (37%; $P < 0.05$) やデキストラン群 (53%) に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。PolyBvHb群では赤血球、Hb共に毛細血管に流入する手前の血管で有意な酸素放出が起こり、一方でMP4群では、赤血球と血漿Hb共に毛細血管内で酸素が多く放出されていた。塩基過剰は毛細血管の酸素放出と直接相関があったが、全身の酸素含量や総酸素放出量とは相関しなかった。赤血球及び血漿Hbの毛細血管での高い酸素抽出は、修飾Hb溶液系の新しい作用機序を示しており、高い酸素親和性は修飾Hb溶液に必用な性質と考えられた。

緒 言

従来のHb利用酸素運搬体は、細動脈の収縮による組織血流の低下、血管抵抗の亢進、そして全身性高血圧を生起し、期待される酸素運搬効果が得られていないのが実情である。この血管活性の機序については議論をよんでいるところであるが、一酸化窒素 (NO) が直接、血管壁中又は血管外漏出後に間質内で、修飾Hb分子により捕捉される、ことが一般的な説明である。しかし我々は、血圧亢進作用の異なるHb修飾体の数種が、同等のNO結合定数を有することを観察している。つまり別の機序として、自己調節機能により、特に細動脈血管壁への酸素過剰供給により血管が収縮し、これが末梢の毛細血管への血流を調節していることが考えられる。酸素の過剰供給は、血漿中で酸素結合した修飾Hbが酸素拡散を促進するためと考えられる。酸素化Hb修飾体分子の拡散は、分子径、粘度、酸素親和度の関数であり、これら三つのパラメータを操作することが、自己調節機能による血管収縮に対し戦略となり得る。

我々はこの発想を人工毛細血管モデルで検討し、血管内の酸素輸送は、 P_{50} が低く分子容積が大きいHb修飾体分子が、赤血球の特性により類似していると結論した。これら研究の結果と考察をふまえ、我々はポリエチレングリコール (PEG)-修飾ヒ

トHb (MP4) を開発し、現在臨床治験を進行中である。

他に我々はPEG修飾Hbが重症出血に対し非常に有効な防御作用を示すことを見出した。本実験で用いたPEG-Hbでは全身性高血圧は観測されなかった。この結論を裏付ける直接的な証拠はないが、この分子の有効性は、血管収縮の欠如と組織血流の改善と考えた。出血性ショック状態のハムスターを用いたMP4の蘇生効果、また、ラット交換輸血でも血圧上昇を起こさない。大量投与を想定し溶液物性 (粘度、膠質浸透圧) を維持するため、比較的Hb濃度を低く調節している (4.2g/dL)、本溶液の組織への酸素輸送能を直接的に評価することが望まれていた。今ではハムスター皮下微小循環観察モデルで、詳細測定が可能である。

本実験では、ヘマトクリット (Hct) 値11%まで血液希釈した後、ハムスター皮下微小循環系の酸素輸送効果について赤血球と血漿中Hb修飾体と別々に直接観測した。また、MP4と比較して分子径や酸素親和度が大きく異なる重合ウシHb (PolyBvHb) や、デキストラン70との比較検討を実施した。微小循環動態と酸素親和度から、微小循環系の酸素輸送量の算出を初めて可能とした。

方 法

実験溶液

デキストラン-70はBraun Medical (Irvine, CA) より、また、PolyBvHb (Oxyglobin) はBiopure (Boston, MA) より購入した。MP4はSangart社 (San Diego, CA) 製造のPEG修飾ヒトHbであり、その調製や性質は既報の通りである。両液体とも生理的等張溶液として調製した。PolyBvHbのHb濃度 (13.1g/dL) はMP4 (4.2g/dL) より高かった。

溶液粘度の測定にはCPE-40 Cone spindleのcone/plate rheometer (モデルDV- , Brookfield; Middleboro, MA) を用い、剪断速度200/sの値を測定した。膠質浸透圧の測定は、コロイド浸透圧計 (モデル4420, Wescor; Logan, UT) を用いた。MP4及びハムスター赤血球の酸素平衡曲線は、100mMリン酸緩衝液 (pH7.4) に分散させ、既報に従い測定した。PolyBvHbについては、既報の平衡曲線をデジタル化し、MLABソフトウェア (Civilized Software; Bethesda, MD) を用いAdairパラメータを解析した。

動物の処置

Golden Syrian ハムスター (55~65g) の背部皮下微小循環観測モデル (Dorsal skinfold window model) を用いた。ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg ip) 麻酔下、背部の毛を除去した後、皮膚を持ち上げチタン製フレームを取り付けた。片側の皮膚と皮下組織は、牽引筋と皮下組織の薄層が残るまで取り除いた。露出部をチタン製フレームに装填した硝子板で塞ぎ、動物の回復に少なくとも二日間待った。浮腫、出血、又は

異常な血管新生が顕著に見られた場合は、実験に使用しなかった。実験に適した動物は再度麻酔をかけ、大腿動脈及び頸静脈にポリエチレンカテーテルを留置。回復後、覚醒下、デキストラン-70で徐々に2回の交換輸血を行い、Hctを前値の60%とした。3回目の血液交換はデキストラン-70, PolyBvHb, またはMP4を用いて実施し、最終的にHctを~11%とした。平均動脈血圧と心拍数を継続して測定した。

微小循環動態の計測

各処置群に少なくとも5匹の動物を使用した。1匹あたり、微小循環動態測定のために少なくとも5つの細動脈と細静脈を選んだ。実験を通して同じ微小血管を検討するため、チャンバー内の血管系をマッピングした。血液希釈の前後に、細動脈と細静脈の直径の測定、血流速度をphotodiode cross-correlation法により測定した。細動脈と細静脈の血流速度(Q)は次の通り計算できる。

$$Q = V(D/2)^2 \quad (1)$$

ここでDは血管の直径、Vは赤血球の速度である。個体によって直径や速度、Flowが異なるため、少なくとも5つの細動脈と細静脈を検討した。最終的なパラメータを決定するため、直径、速度、及びFlowを全例の全血管、すなわち個体当たりの決定因子数は最低でも25とし、平均化した。

血管内及び隣接組織の酸素分圧測定には、Palladium-porphyrin 燐光解消法を用いた。Palladium-meso-tetra(4-carboxy-phenyl) porphine (10.1 mg/ml) を静注し(15 mg/kg), 10分経過してから測定した。同時に動脈血圧、血液ガス、及び酸-塩基状態、Hct、総Hb濃度、血漿中Hb濃度を測定した。

有効毛細管密度(Functional Capillary Density: FCD)の定義は、30秒の観察時間に赤血球の通過がみられる毛細血管の単位組織面積あたりの総延長のことであり、0.5 mm²の範囲を観察した。このパラメータは元々LindbomとArforsにより提唱され、ハムスターのショック試験において生死を予測できる最適指標であることが示されている。

Adair変数と演算手法から酸素飽和度を計算するため、全身、細動静脈のPO₂の値を用いた。血漿Hbの酸素量は次の通り計算できる。

$$O_{2\text{plasmaHb}} = \text{Hb}_{\text{plasma}} \times [1 - (0.01 \times \text{Hct})] \times 1.34 \times Y_{\text{plasmaHb}} \quad (2)$$

ここでHb_{plasma}は単離血漿中Hb濃度(g/dl)である。Y_{plasmaHb}は、血漿Hbの酸素飽和度であり、上述の通り、PO₂から計算される。定数1.34を用いHb(g/dL)濃度から酸素(mL/dL)に変換する。赤血球Hbの酸素量は次の通り計算できる。

$$O_{2\text{RBC}} = 1.34 \times [\text{Hb}_{\text{total}} - (\text{Hb}_{\text{plasma}} \times (1 - 0.01 \times \text{Hct}))] \times Y_{\text{RBCHb}} \quad (3)$$

ここでHb_{total}は血中の総Hb濃度であり、Y_{RBCHb}は赤血球Hbの酸素飽和度である。血漿中に溶解する酸素量(O_{2dis})は次の通り計算できる。

$$O_{2\text{dis}} = \text{PO}_2 \times (2.3/760) \quad (4)$$

ここで2.3は血中の酸素の溶解定数(mL · dL⁻¹ · atm⁻¹)である。

最後に、precapillary(毛細血管に入る手前の微小血管)と毛細血管の酸素放出については、次の通り計算できる。

$$O_{2\text{precap}} = (C_{\text{arterial}} O_2 - C_{\text{arteriolar}} O_2) \quad (5)$$

$$O_{2\text{cap}} = (C_{\text{arteriolar}} O_2 - C_{\text{venular}} O_2) \quad (6)$$

ここでO_{2precap}とO_{2cap}はそれぞれ毛細血管の手前の微小血管と毛細血管で放出される酸素量であり、C_{arteriolar} O₂とC_{venular} O₂は同様にそれぞれの酸素濃度である。

結 果

実験溶液

デキストラン-70は粘度(2.8 cP)と膠質浸透圧(49.9 mmHg)がMP4とほぼ同じであるため、酸素輸送効果の無い比較溶液として用いた。PolyBvHbとMP4の粘度は類似しており(それぞれ2.0と2.5 cP)、コロイド浸透圧も類似していた(それぞれ45と49mmHg)。MP4ストック溶液のHb濃度は4.2 g/dLであり、PolyBvHbは13.1 g/dL、ハムスターの血液では14.5 g/dLであった。

ハムスター血液のP₅₀(33.9 mmHg)はヒトより僅かに高く、PolyBvHbのP₅₀(54.2 mmHg)は非常に高い。PolyBvHbの右方シフトの程度については疑問点がある。測定法(Hemox Analyzerのこと)の問題として、室内空気(~150mmHg)での酸素飽和度が100%と設定していることである。もしこのPO₂でHbが完全に飽和されていない場合、P₅₀が誤って低く測定される。この問題は、酸素含量の高いガスを用いてHb溶液を酸素飽和することで幾分は解決できる。別の方法は、本実験でも採用したように、最終飽和度をパラメータとしてAdair式でデータ処理することである。注目すべきことは、MP4のP₅₀(5.4 mmHg)はハムスターの赤血球やPolyBvHbよりも非常に低いことである。更に、協同性(N)の低下にも注目して欲しい(ハムスター血液, 1.51; polyBvHb, 1.17; MP4, 1.25)。

交換輸血

各実験群で全例が血液希釈と交換輸血を問題なく受けた。MP4交換により血漿Hb値が1.12 ± 0.03g/dLとなり、それにより血液の総Hb(RBC + MP4)は4.80 ± 0.12 g/dLに上昇した。投与したPolyBvHbのHb濃度はMP4よりかなり高いため、交換後

の血漿Hbは 3.74 ± 0.29 g/dL, 総Hb (RBCs + PolyBvHb) は 6.70 ± 0.25 g/dLであった。デキストラン群は予想通り, 最低のHb値を示した (3.44 ± 0.11 g/dL)。血液希釈後に各群Hct値は有意に異なることはなかった。血液希釈後には血液の粘度は測定しなかった; しかし, 粘度の主な決定因子はHctであり, また溶液がこの性質に非常に良く適合するため, 血液希釈後に群間でほとんど又は全く差がないと予想される。

血液ガス及び酸塩基平衡

血液希釈後のpHと塩基過剰の低下から, 組織への酸素輸送がデキストラン > PolyBvHb > MP4の順に不十分であることを示す。PO₂上昇とPCO₂低下は, デキストラン > PolyBvHb > MP4の順であった。呼吸による代償作用を示すが, デキストラン群とPolyBvHb群では不十分であることを示す。これら所見は, MP4群が極度な貧血状態に最も良く対処し, デキストラン群が最低, PolyBvHb群が中程度であることを示す。

PO₂は全例で, 全身動脈血PO₂に比べ細動脈内PO₂で有意な低下が見られた。しかし, PolyBvHb群における細動脈, 細静脈, 及び組織PO₂値は, MP4群より全て有意に低かった ($P < 0.05$)。血液希釈後, 動脈血pHはMP4群に比べデキストラン群で有意に低かった ($P < 0.05$)。デキストラン群の塩基過剰の低下 (12.62 meq/L) は, MP4群 (1.48 meq/L) やPolyBvHb (3.00 meq/L) より有意に大きかった ($P < 0.05$)。

組織PO₂値は, 極度な血液希釈後に予想されるように, 全群で極めて低かった。しかし, PolyBvHbに比べMP4の組織PO₂は高く, 統計的に有意である ($P < 0.05$)。

全身および末梢の循環動態

MP4群, PolyBvHb群共に平均動脈血圧を維持した; しかし, デキストラン群では, 平均動脈血圧が初期値の65%まで低下した。同様に, MP4群とPolyBvHb群の心拍数は変動しなかったが, デキストラン群では, 僅かではあるが有意な心拍数の低下が認められた。

細動脈径はPolyBvHb群のみ僅かに, しかし有意に減少した。細動脈赤血球流速および流量は全群で有意に低下したが, 群間に差は無かった。これに対し細静脈径は, MP4群及びPolyBvHb群に比べ, デキストラン群で有意に小さかったが, 細静脈赤血球速度と流量は, デキストラン群で上昇した。細静脈赤血球速度と流量はPolyBvHb群のみ, 有意に低下した。

全群でFCDは低下したが, MP4群 (初期値の66.5%) に比べ, PolyBvHb群 (初期値の36.7%) においてFCDは有意に低かった ($P < 0.05$)。デキストラン群のFCDは中程度であり (53.2%), これは初期値より有意に低かったものの, 他の2群の動物とは差はなかった。

酸素の分布

赤血球, 血漿Hb, および血漿中の溶解酸素量の計算には, Hb分布, 測定PO₂, Hbの酸素飽和度を用いた。赤血球の酸素放出に関しては, PolyBvHb群で高値となる傾向があったが, MP4群, PolyBvHb群, デキストラン群の間では, 毛細血管に到達する前において, 放出量に統計的有意差は無かった。しかし興味深いのは, MP4群に比べ, Hb結合酸素が大量に毛細血管に到達する手前で放出されることである ($P < 0.001$)。本質的にMP4結合酸素は毛細血管の手前では放出されないが, これは高い酸素親和性と, 血管内の比較的高いPO₂に起因している。

MP4群では毛細血管の手前よりも毛細血管内で酸素が有意に多く放出され, 逆にPolyBvHb群では毛細血管内での酸素放出が有意に少なく, 統計的にも有意な差である ($P < 0.001$)。デキストラン群では, 酸素放出が毛細血管到達前と毛細血管で均等に分布している。

赤血球, 血漿Hb, 及び血漿中溶解分の各酸素抽出値については, 非常に興味深いことに, MP4群の赤血球の酸素抽出率 (すなわち輸送された動脈酸素%) が毛細血管の手前で28%, 毛細血管では47%が算出された。これに対し, PolyBvHb群の赤血球は毛細血管の手前で結合酸素の43%を放出し, 毛細血管では14%だけであった。酸素総放出量 (赤血球 + 血漿Hb + 溶解) という点では, MP4群で毛細血管において動脈酸素量の62%を放出し, 毛細血管の手前の血管では31%であった。これに対し, PolyBvHb群では毛細血管の手前で総動脈酸素の69%を放出し, 毛細血管では31%のみであった。デキストラン群では赤血球の酸素放出が毛細血管の手前と毛細血管でほぼ均等に行われ, 溶解酸素の寄与分は無視できる程度であった。

毛細血管ネットワークの酸素取込み絶対量 (VO₂) は体積流量 (volume flow) なしでは計算できないが, 微小循環動態の測定結果は, MP4群で増加した酸素抽出が毛細血管の流量増大のみにより生じたことを示唆していない。MP4群では, FCDがPolyBvHb群に比べ有意に大きい ($P < 0.05$), 細動脈と細静脈の血流は, MP4群で大きいものの, PolyBvHb群との統計的な差を認めなかった。

全身的酸素輸送

微小循環系の酸素分布が全身の酸素供給を反映するか否かを評価するため, 動脈血の塩基過剰を用いた。弱い相関が動脈の塩基過剰と動脈の酸素含量 ($r^2 = 0.479$), Hct ($r^2 = 0.275$), 総Hb ($r^2 = 0.324$) 及び血漿Hb濃度 ($r^2 = 0.196$) に認められた。これに対し, 塩基過剰と毛細血管酸素放出の間の相関性は0.976であり, このパラメータが全身の酸素供給を示すことを示唆している。

論 考

MP4で血液希釈した場合, 動脈血酸素含量の62%が毛細血管

で放出される。これはPolyBvHbの場合（僅か31%が毛細血管で放出）や、デキストラン-70の場合（40%）と明らかに異なる。毛細血管での酸素放出が組織の酸素要求量を満たすために有効であることは、毛細血管の酸素放出と、全身の組織酸素化の指標である動脈血の塩基過剰との相関から支持される。

血漿Hb濃度は僅か1.12g/dLであるが毛細血管からの酸素輸送の総量は3.99ml/dLであり、これはMP4が酸素輸送に非常に有効であることを示す。これは血漿Hb濃度が3.74 g/dL、毛細血管酸素輸送が2.35 ml/dLであったPolyBvHb投与群とは対照的である。Hb 1 g当たり、5倍以上の有効性を示す。MP4はそれ自体が毛細血管まで酸素を運ぶだけでなく、赤血球内Hbに結合した酸素をより多く毛細血管内で放出させている。二種のHbの比較から可能性として、PolyBvHbは毛細血管に到達する前に酸素を放出し、毛細血管に輸送すべき量から酸素を“失った”ということである。この概念は、修飾Hb溶液の低酸素親和度（高 P_{50} ）が酸素の促進拡散と血管からの消失を促すことを観察した我々の結果と一致している。

毛細血管での酸素放出を促進する他の要素は有効毛細管密度（FCD）である。MP4群では、FCDが前値の67%であり、一方で、PolyBvHb群ではFCDは37%まで減少している（ $P < 0.05$ ）。デキストラン群のFCD（53%）は中間の値であり、有意な差は見られなかった。毛細血管に到達する前の酸素消失が多いと細動脈収縮を刺激し、収縮部位近傍の血圧を上昇させ、その下流部位の血圧を下げることになる。これは毛細血管内灌流圧の低下に繋がり、赤血球流動の減少（いわゆるFCDの低下）、Hct低下、そして組織への酸素輸送を低下させると考えられる。我々の実験結果はこの機序を証明できていないが、血管径の変化が小さすぎて、現行法では多分検出できない。

毛細血管に到達する前での酸素消失の増大は、ラット及びハムスター実験モデルにおいて微小電極法で観察されており、更に最近より高度な顕微鏡 PO_2 測定法でも確認されている。本研究で毛細管前血管の PO_2 は20~40 mmHgであり、血管内 PO_2 が局所的な血管収縮を生起する鋭敏なエフェクターであることを示唆する。これはGuytonが示唆する毛細血管の手前の活約筋に対する効果と同様で、細動脈にも同様に作用すると考えられる。ウサギtenuissimus微小循環の研究では、FCDが PO_2 に反比例することが明らかにされている。

酸素の促進拡散輸送におけるHb溶液の関与については、多くの研究者が課題としてきた。1960年にはScholanderが、Hb溶液を介した酸素拡散が血漿に比べて8倍速いこと、そしてこの速度がHb濃度や酸素親和度により制御できることを示した。最近の測定でこれらの知見が確認されている。血漿中に存在するHbは、血管壁への酸素供給を顕著に増加させる。修飾Hb溶液やカプセル化Hbの測定も行われている。殆どの実験が静的な溶液内で行われ微小血管内の血流状態とは異なり、攪拌条件、

酸素放出の血流速依存性、赤血球の存在などが実験を複雑にしている。しかし、人工毛細血管を用いた我々のin vitro直接観測では、Hb溶液の酸素取込みと放出が赤血球よりも有効であることが示された。同様の機序によりヒトにおいても、PolyBvHbが肺での酸素拡散能を高める。しかし赤血球をHb溶液で置換し、筋肉組織の効率的な酸素化を目的とした実験では、それが実証されていない。我々の実験結果から考えると、PolyBvHbは、酸素放出の大部分が毛細血管に到達する前に起こり、これが自動制御的な血管収縮をもたらす、同時に血管壁での酸素消費量が増大していることを示唆する。この説明はまた、架橋Hbを動物やヒトに投与した際、酸素運搬能の増大が血管収縮により相殺され、組織酸素化が損なわれるという観察結果と一致している。

血漿中にHbが導入されて上述の現象が生起するのであれば、Hb溶液による酸素治療を成功させるための重要項目は明らかである。つまり、1) Hbの酸素親和性の上昇、及び、2) Stokes-Einsteinの法則（7式）に基づく、粒径や粘度の増大による分子拡散性の減少である。

$$D_{HbO_2} = (KT)/(6 \quad r) \quad (7)$$

ここで D_{HbO_2} はHb分子の拡散定数であり、 K はBoltzman定数、 T は絶対温度、 η は粘度、 r は分子半径である。MP4は従来の修飾Hbに比べ分子径や粘度が高いため、 D_{HbO_2} が減少し、そして本研究では、高いFCDと血管活性の低下、及び毛細血管での効果的な酸素化を可能にすることが示唆された。

大動脈リング切片がHbにより収縮するex vivo実験結果は、NO捕捉に起因するものと説明されがちであり、NO親和性の減少した変異Hbが自然のHbより昇圧作用が低いことも報告されている。しかし、大動脈又は細動脈のいずれかの収縮が全身の血圧を上昇させるが、毛細血管の灌流を制限するのは細動脈の血管収縮である。

毛細血管の血流制御、赤血球内へのHbの封入、および血漿が示す低い酸素溶解度は、生理学的、化学的、物理学的な特徴であり、これらが酸素輸送システムを構築しているのである。何百万年もの生物の進化の過程の産物である。酸素が血管外へ移動するには、赤血球内の酸素拡散の制限、赤血球の外周の非攪拌血漿からの拡散、そして血管径と流動状態に依存して厚さが変化する血漿層からの拡散など、拡散障壁を越える必要がある。結局のところ、血管壁からの酸素放出は、血管壁の血漿層を透過する拡散距離、酸素の拡散定数、溶解性、及び血管壁の酸素濃度勾配の関数である。これらの因子に基き、本来血液は毛細血管に到達する前まで酸素を保持しているのである。

哺乳類など複雑な生物が抱える本質的な課題は、肺から組織へ損失を最小限に抑えて酸素を運搬することであり、十分に酸

素供給された組織ではなく、毛細血管で酸素の大部分が放出されることである。拡散性の高い修飾Hbを投与すると、この仕組みが正常に作動せず、毛細血管に入る前に酸素の放出を促進し、代謝亢進組織への酸素供給を減少させるための自己防御機構が誘発される。毛細血管に入る前の酸素放出を遅らせるよう修飾Hbの性質を選定することにより、この問題は解決できる。

最後に、赤血球輸血の場合には総Hb濃度またはHctの簡単な測定で得られる動脈血酸素含量は、少なくとも塩基過剰を指標とした組織酸素化とは相関がない。このことは臨床的に重要な意味を示しており、Hb濃度とHct値を組織酸素輸送の指標として何世紀もの間信頼して使ってきたことが出来なくなることになる。代わりに、患者にMP4のような修飾Hb溶液酸素輸送体を使ったとき、酸素輸送状態を評価する他の新しい方法が必要になるだろう。

訳者のコメントの引用文献

1. Vandegriff KD and Olson JS. The kinetics of O₂ release by human red blood cells in the presence of external sodium dithionite. *J Biol Chem* 1984;259:12609-12618.
2. Sakai H, Tsai AG, Rohlfis RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, and Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:H553-H562.
3. McCarthy MR, Vandegriff KD, and Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 92: 103-117, 2001.
4. Nishide H, Chen XS, and Tsuchida E. Facilitated oxygen transport with modified and encapsulated hemoglobin across non-flowing solution membrane. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* 1997;25:335-346.
5. Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, Takeoka S, Maeda N, Tsuchida E. O₂-Release from Hb-vesicles evaluated using an artificial narrow O₂-permeable tube: comparison with RBC and acellular Hb.. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2543-H2551.
6. Page TC, Light WR, McKay CB, and Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/ hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res* 1998;55:54-66.
7. Baines AD, Adamson G, Wojciechowski P, Pliura D, Ho P, and Kluger R. Effect of modifying O₂ diffusivity and delivery on glomerular and tubular function in hypoxic perfused kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998;274:F744-F752.
8. Tsai AG, Kerger H, and Intaglietta M. Microcirculatory consequences of blood substitution with -hemoglobin. In: Winslow RM, Vandegriff K, Intaglietta M, eds. *Blood Substitutes: physiological basis of efficacy*. Boston: Birkhauser, 1995;155-174.
9. Linberg R, Conover CD, Shum KL, and Shorr RGL. Increased tissue oxygenation and enhanced radiation sensitivity of solid tumors in rodents following polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin administration. *In Vivo* 1998;12:167-174.
10. Winslow RM, Lohman J, Malavalli A, and Vandegriff KD. Comparison of PEG-modified albumin and hemoglobin in extreme hemodilution in the rat. *J Appl Physiol* 2004;97:1527-1534.
11. Wang L, Morizawa K, Tokuyama S, Satoh T, and Tsuchida E. Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells(ARC) *Polymer Adv Technol* 1992;4:8-11.
12. Contaldo C, Schramm S, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1140-H1147.
13. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen-affinity hemoglobin facilitates rapid recovery from ischemic acidosis after cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs* 2004;7:101-106.13.
14. Sakai H, Cabrales P, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P_{50s} from occluded arteriole in hamster skinfold window model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2897-H2903.
15. Contaldo C, Plock J, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leung M, Banic A, Erni D. Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue. *Crit Care Med* 2005;33:806-812.
16. Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen transport by low and normal P₅₀ Hb-vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288: H1885-H1892.

編集後記

本号は第12回日本血液代替物学会の開催後の号となり、それに関連する原稿をなるべく多く掲載するために出版が遅れました。本学会のメイン対象物である人工赤血球の研究も臨床治験がまもなく開始される動きもあって、ますます活性化されると思います。同時に、製造に関しては原料確保やバリデーションの問題があると思いますし、医療現場での受入れ体勢や環境を

整備する必要性もあると思います。これらに関する多方面からの投稿をお待ちしております。欧米でのこの領域も動いている様で、引き続きウオッチングして情報を流して行きたいと思います。

(武岡 真司)

投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords(英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハード

- コピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(、)とピリオド(．)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N / 10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ^{3,5)}, ^{1,4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名 西暦発行年; 巻数: 頁~頁. とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁. の順とする。
 1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
 2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular

- retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
 - 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
 - 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

[本誌掲載著作物の二次利用および著作権について]
以下の点につきまして、あらかじめご了承ください。

本誌の一部、もしくは全部をCD-ROM、インターネットなどのニューメディアに二次利用させていただく場合があります。本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は本学会に譲渡されたものとします。したがって、上記の諸権利の承諾は本学会で行います(本項については、著作者ご自身の再利用を拘束するものではありませんが、再利用される場合はご一報ください)。掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

武岡真司(委員長), 東 寛, 池淵研二, 小林 薫, 酒井宏水, 福島昭二, 堀之内宏久, 村田 満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.13(3) 2005年11月29日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>